Proteinsynthese in isolierten Rattenleberzellen unter besonderer Berücksichtigung der Biosynthese der Cytochromoxidase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

GERD RIES

aus Oestrich

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Proteinsynthese in isolierten Rattenleberzellen unter besonderer Berücksichtigung der Biosynthese der Cytochromoxidase

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

Vorgelegt dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

GERD RIES

aus Oestrich

Marburg/Lahn 1978

Druck: Mauersberger, Marburg

Vom Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg/Lahn als

Dissertation angenommen am 20.1.78

Tag der mündlichen Prüfung 8.2.78

Berichterstatter: Prof. Dr. B. Kadenbach
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Follmann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

Seite

I Einleitung und Problemstellung 1

II Material und Methoden 14

1. Material 14

2. Methoden 16

2.1. Herstellung isolierter Rattenleberzellen 16

2.2. Inkubation isolierter Rattenleberzellen 22

2.3. Einbau radioaktiver Aminosäuren in Protein 23

2.4. Vorbereitung der Proben zur Radioaktivitätsmessung 24

2.5. Radioaktivitätsmessung 25

2.6. Proteinbestimmungen 25

2.7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese 25

2.8. Immunologische Untersuchungen 29

2.9. Bestimmung der Cytochromoxidaseaktivität 34

2.10. Harnstoffbestimmung 35

2.11. Isolierung von Zellfraktionen aus Rattenleber 35

2.12. Isolierung der Cytochromoxidase aus Rattenleber 35

2.13. Markierung mit radioaktiven Aminosäuren "in vivo" 36

Seite

III Ergebnisse 37

1. Proteinsynthese in isolierten Rattenleberzellen 37

1.1. Experimente zur Charakterisierung des Einbaus von radioaktivem Leucin in Zellprotein 37

1.2. Experimente zur Bestimmung der Proteinsyntheserate 45

1.3. Untersuchungen über den Einfluß von Hemmstoffen der Proteindegradation auf den Proteinmetabolismus 53

2. Immunologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Cytochromoxidase 60

2.1. Ouchterlony-Tests 60

2.2. Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität durch Antikörper (IgG B) 71

2.3. SDS-Gelelektrophorese von Immunpräzipitaten mit Antikörpern gegen Cytochromoxidase 73

2.4. Titerbestimmungen 79

2.5. Zeitabhängigkeit der Bildung von Immunpräzipitaten 82

2.6. Titration von Zellextrakten mit IgG H 83

3. Biosynthese der Cytochromoxidase in isolierten Rattenleberzellen 86

Seite

3.1. Untersuchungen mit Antiserum A 86

3.2. Untersuchungen mit IgG B 94

3.3. Puls-Chase-Experimente 99

3.4. Experimente zur Biosynthese der Cytochrom-oxidase "in vivo" 107

IV Diskussion 112

1. Methode der Isolierung von Rattenleberzellen 112

2. Proteinsynthese in isolierten Rattenleber-zellen 114

3. Immunologische Untersuchungen von Anti-körpern gegen Cytochromoxidase 120

4. Biosynthese der Cytochromoxidase 123

V Zusammenfassung 129

VI Literaturverzeichnis 132

Abkürzungen:

Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
CAP	Chloramphenicol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Bis-(aminoäthyl)glycoläther-N,N,N',N'-tetraessigsä
I	Ionenstärke
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Leu	Leucin
Met	Methionin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen/Minute
s.c.	subcutan
SDS	Na-dodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UZ	Ultrazentrifuge
v.	Vena

I Einleitung und Problemstellung

Die Cytochromoxidase (EC 1.9.3.1.) ist die terminale Oxidase in der Atmungskette aller aeroben Organismen. Dieses, von Mac Munn 1886 entdeckte (1) und von Keilin und Hartree 50 Jahre später (2) als Warburg'sches Atmungsferment identifizierte Enzym findet sich in Pflanzen, Tieren, Hefen, Algen und einigen Bakterien.
Die charakteristische Funktion der Cytochromoxidase ist die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Die dazu notwendigen 4 Elektronen werden von reduzierten Cytochrom c-Molekülen geliefert. Die bei der Sauerstoffreduktion freiwerdende Energie ermöglicht die oxidative Phosphorylierung und liefert somit das von der Zelle als universellen Energieträger verwendete ATP. Die Bedeutung der Cytochromoxidase für den Energiehaushalt der Zelle wird deutlich, wenn man bedenkt, daß durch die Oxidation von Glukose zu CO_2 und H_2O zehnmal mehr Energie freigesetzt wird, als durch den anaeroben Abbau.

In Eukaryonten ist die Cytochromoxidase in der inneren Membran von Mitochondrien, in Prokaryonten in der Zellmembran lokalisiert.
Auf den Arbeiten von Straub (3) und Yakushiji (4) aufbauend, wurden Methoden zur Extraktion des Enzyms aus der Membran mit Hilfe von Detergentien entwickelt (Übersicht: Ref.5). Eine neuere Methode (6,7) beruht auf Untersuchungen von Jacobs et al. (8-10) und kombiniert eine Vorbehandlung der Mitochondrien mit Triton X-114 mit einer selektiven Extraktion des Enzyms mit Triton X-100. Andere Autoren (11) verwenden ein Oleyl-Polymethacrylsäureharz zur Isolierung.

Die so isolierte Cytochromoxidase enthält noch Phopholipide (5,12-14), die nur unvollständig durch Austausch von Detergentien (einer Methode zur vollständigen Entfernung von Lipiden von Membranproteinen, Ref.15,16) ent-

fernt werden können (17). Lipide oder nichtionische Detergentien sind für die enzymatische Aktivität der Oxidase essentiell (5,13,17,18).

Der Mechanismus der Enzymaktivität ist bis heute ungeklärt. Das Wesentliche der schon von Keilin et al. 1939 (19) entwickelten und noch bis vor kurzem vertretenen (5) "klassischen" Theorie ist die Unterscheidung der Cytochrome a und a_3 als zwei verschiedene Spezies und die Annahme eines Elektronenflusses längs der Cytochromkette c_1-c-a-a_3-O_2. Neuere Arbeiten dagegen postulieren eine Äquivalenz und komplizierte Zyklen der Cytochrome a und a_3 während der Elektronenübertragung von Cytochrom c auf den Sauerstoff (18 und dortige Literatur, 20-24).

An der Strukturaufklärung der Cytochromoxidase wird intensiv gearbeitet. So weiß man heute, daß sich das Enzym aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt, die in äquimolaren Mengen vorhanden sind.
Von N. crassa (25,26) und S. cerevisiae (27-29) konnten 7 Untereinheiten isoliert werden, während von dem Enzym aus Rinderherzen zunächst 6 (30,31), dann 7 (32) und neuerdings 8 (33) Untereinheiten gefunden wurden.
Koch (35) konnte das Enzym aus Oocyten von X. laevis in 6 Untereinheiten aufspalten, Jeffreys und Craig (36) vermochten Cytochromoxidase aus Mäusen und Menschen in nur 4 Untereinheiten zu trennen. Allerdings sollte man in letzterem Fall die schlechte Qualität der Auftrennung berücksichtigen.
Cytochromoxidase aus Rattenleber konnte durch verschiedene Methoden in 7 Untereinheiten zerlegt werden (7,37).

Im allgemeinen wird eine größenordnungsmäßige Übereinstimmung der Molekulargewichte der Untereinheiten aus verschiedenen Organismen angenommen. Neuerdings zeigt jedoch

eine Untersuchung von Capaldi et al. (34), daß die Mobilitäten der Untereinheiten der Cytochromoxidase in unterschiedlichen Gelsystemen so voneinander abweichen können, daß die übliche Reihenfolge der Banden auf dem Gel durcheinander gerät.

Untersuchungen über die Biosynthese der Oxidase von N. crassa und S. cerevisiae unter Verwendung spezifischer Hemmstoffe der mitochondrialen oder cytoplasmatischen Proteinsynthese ergaben, daß die größeren drei der 7 Untereinheiten in den Mitochondrien (26,28,29) die restlichen im Cytoplasma (29,30,38) synthetisiert werden.
Derartige "in vivo" Untersuchungen sind an höheren Eukaryonten sehr schwierig und kaum durchgeführt. Obwohl solche Experimente am Rind nicht durchgeführt wurden, lassen die physikalischen Eigenschaften der drei großen Untereinheiten des Enzyms aus Rinderherzen deren mitochondrialen Ursprung auch hier vermuten (31). Aminosäureanalysen der Untereinheiten I und II ergaben N-formyl-Methionin als N-termini (33) und stützen somit die Annahmen über den Ursprungsort (Initiation der Proteinsynthese in Mitochondrien erfolgt durch N-formyl-Methionin:Ref.39,40,41).
Die Sensitivität gegen Chloramphenicol, ein Hemmstoff der mitochondrialen Proteinsynthese spricht für die Biosynthese der drei großen Untereinheiten der Cytochromoxidase aus X. laevis Oocytenkulturen in den Mitochondrien (35).
Dies gilt auch für die größte Untereinheit des Enzyms aus Mäusen und Menschen (36).
Über die Biosyntheseorte der Cytochromoxidaseuntereinheiten aus Rattenleber ist noch nichts bekannt, da "in vivo" Untersuchungen bislang negativ verliefen (7).

Untersuchungen zur Frage der Anordnung der Untereinheit im Holoenzym sind relativ schwierig, da die Cytochromoxidase

die innere Mitochondrienmembran durchdringt (42-45). Die Anwendung von Oberflächenreagenzien (46) oder vernetzenden Agentien (47,48) auf membrangebundene oder isolierte Cytochromoxidase aus S. cerevisiae lassen die Vermutung zu, daß Untereinheit I vollständig, Untereinheit II teilweise in der Membran verborgen liegt, während alle anderen Untereinheiten mindestens teilweise aus der Membran herausragen. Für die Untereinheit III wird die Nähe zu einer Cytochrom c-Bindungsstelle an der Oxidase diskutiert (47,48).

Anders in Rinderherzmitochondrien: hier scheinen die Untereinheiten I und IV in der Membran zu stecken, die Peptide II, V und VI auf der Außenseite und Untereinheit III auf der Innenseite der inneren Membran zu liegen (49).

Berücksichtigt man Befunde an Rattenlebermitochondrien (50) und Rekonstitutionsversuche mit Liposomen (42, 50-53), so scheinen bisher nur 2 Punkte klar zu sein:

a) die Cytochromoxidase ist zum größten Teil in der Membran verborgen, auf jeder Seite ragt ein Teil des Enzyms heraus,
b) die Oxidase ist in der Membran asymmetrisch gelagert, wobei Cytochrom a auf der Außenseite, Cytochrom a_3 auf der Innenseite der Membran lokalisiert ist.

Es wurde schon erwähnt, daß ein Teil der Untereinheiten der Cytochromoxidase in den Mitochondrien synthetisiert wird. Es stellt sich die Frage, ob die Mitochondrien auch für diese Proteine codieren.

Man weiß heute, daß Mitochondrien eine kleine, zirkuläre DNA und einen den Bakterien ähnlichen Transcriptions- und Translationsapparat besitzen (Übersicht: Ref.39,54,55).

Während man bis vor einiger Zeit noch Sequenzhomologien zwischen mitochondrialer und nuklearer DNA bestritt (54), zeigen neuere Arbeiten signifikante Mengen homologer DNA-Stränge auf (56,57), deren Bedeutung unklar ist. Zwischen dem mitochondrialen und dem bakteriellen Translationsapparat konnten inzwischen einige deutliche Unterschiede

aufgezeigt werden (Übersicht: Ref.39,58), was zu alternativen Vorstellungen zum Endosymbiontenmodell geführt hat (58).
Während durch Experimente mit Hemmstoffen (26,28,29) die Mitwirkung des mitochondrialen Tranlationsapparates bei der Synthese mitochondrialer Proteine sehr wahrscheinlich gemacht wurde, war die Beteiligung mitochondrialer DNA und des Transkriptionsapparates sehr umstritten (59), zumal bei einer Größe von nur 10^7 Dalton der Import von RNA aus dem Zellkern in die Organelle gesichert schien (60-63).
Genetische Experimente (Übersicht: Ref.64) jedoch haben zweifelsfrei gezeigt, daß mitochondriale DNA auch für mitochondrial synthetisierte Proteine codiert.
Der mitochondriale genetische Ursprung einiger Untereinheiten der Cytochromoxidase aus S. cerevisiae wurde von mehreren Autoren belegt (65-67). Diese Befunde wurden auch durch Translation von mt-DNA in zellfreiem System (68-70) bestätigt, wobei u.a. die drei großen Untereinheiten der Cytochromoxidase synthetisiert wurden.
Isolierte Mitochondrien aus N. crassa sind in der Lage, Untereinheit III der Oxidase, unter bestimmten Bedingungen auch Peptid I und II , zu synthetisieren (71).

Von den (vermutlich bis zu 20) in den Mitochondrien codierten und synthetisierten Proteine konnte man bislang nur identifizieren: 3 Untereinheiten der Cytochromoxidase, 4 der ATPase und 2 des Cytochrom b-c_1-Komplexes. Sie zeichnen sich aus durch ihre Zugehörigkeit zu asymmetrischen Membranenzymen, die sich aus cytoplasmatischen und mitochondrialen Einheiten zusammensetzen und weiterhin durch eine auffallende Hydrophobizität.
In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Koordination der cytoplasmatischen und mitochondrialen Proteinsynthese.

Erste Untersuchungen unter Verwendung spezifischer Hemmstoffe der mitochondrialen und der cytoplasmatischen Proteinsynthese und mit Mutanten (26,65,72,73) ergaben, daß mitochondrial synthetisierte Proteine nur dann in größeren Mengen gebildet werden, wenn ihre cytoplasmatischen Gegenstücke ebenfalls kontinuierlich nachgeliefert werden. Dies wird durch neuere Arbeiten bestätigt (71,74.75) und gilt auch für die ATPase (76).
Umgekehrt scheint auch das mitochondriale genetische System die Proteinsynthese im Cytoplasma zu beeinflussen (64,77,78), obwohl dies an anderer Stelle von den gleichen Autoren bestritten wird (65). Zu dieser Unklarheit tragen auch der Bericht Küntzels (79) über die Existenz eines mitochondrial synthetisierten cytoplasmatisch wirkenden Proteinsynthesesupressors und die Befunde von Beattie (80) über die Regulation der mitochondrialen Proteinsynthese durch cytoplasmatisch gebildete Proteine bei.

Kompliziert wird dieses Bild auch durch Arbeiten von Poyton (74,75), wonach in S. Cerevisiae ein Precursorkomplex, gebildet aus den Untereinheiten IV-VII und einem Extrapeptid, existieren soll. Dagegen finden Werner et al. (71) in Anlehnung an Schwab et al. (81) in N. crassa die Untereinheiten VI und VII getrennt als Precursor.

Die Frage, wie die Zelle einmal den vektoriellen Transport cytoplasmatischer Untereinheiten der Cytochromoxidase vom endoplasmatischen Retikulum zu den Mitochondrien, zum anderen den Transport durch die äußere und zum Teil auch durch die innere Mitochondrienmembran und schließlich auch noch die korrekte Assemblierung der Untereinheiten in das Holoenzym bewerkstelligen kann, ist völlig offen. Untersuchungen von Butow et al. (82,84) führten zu einem Bild, das ähnlich wie für sekretorische Proteine eine vektorielle Synthese von cytoplasmatisch synthetisierten Mitochondrienproteinen durch die äußere Mitochondrienmembran

hindurch durch 80S Ribosomen, die an der äußeren Mitochondrienmembran hafteten, umriß.
Diese Möglichkeit scheint allerdings nach den Bildern der Ultrastruktur der Mitochondrien in der Vergangenheit sowie auch durch Arbeiten von Hallermeyer (85,86) sehr zweifelhaft.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Biosynthese der Cytochromoxidase in Rattenleber zu untersuchen. Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen Erkenntnisse schien es sinnvoll, ein experimentelles System zu suchen, das sowohl die Nachteile von isolierten Mitochondrien (unbefriedigende Proteinsynthese, keine Assemblierungsstudien möglich) als auch die eines "in vivo"-Systems (nur ein Experiment pro Tier, Verteilung von Radioaktivität über den gesamten Organismus) vermeidet, gleichwohl aber deren jeweilige Vorteile (Mitochondrien: viele Proben auf einmal, "in vivo": Assemblierungsstudien möglich) bewahrt.

Diesen Anforderungen scheinen isolierte Rattenleberparenchymzellen weitgehend zu genügen: Mitochondrien befinden sich in isolierten Hepatocyten sicherlich in einer "natürlicheren" Umgebung als in einem noch so kompliziert substituierten synthetischen Medium. Außerdem kann man vermuten, daß bei intakter Koordinierung von cytoplasmatischer und mitochondrialer Proteinsynthese, Untersuchungen der Assemblierung der Oxidase möglich sind.
Es stellt sich allerdings die Frage, in wieweit isolierte Rattenleberparenchymzellen die Eigenschaften des "in vivo"-Systems konserviert haben.

Die Kenntnisse aus der Literatur zu dieser und der Frage der Isolierung von Hepatocyten sind in den folgenden Abschnitten zusammengefaßt.

In der Vergangenheit ist die isolierte, perfundierte Rattenleber sehr häufig für biochemische Studien verwendet worden. Obwohl sich dieses System für manche Untersuchungen als ausgezeichnet erwies, hat es doch auch Nachteile:

a) die Leber enthält bis zu 40% Nichtparenchymzellen (87,88),
b) die Auswirkung von Variationen mehrerer experimenteller Parameter an einer Leber ist unmöglich zu verfolgen.

Isolierte Leberparenchymzellen sollten diese Schwierigkeiten vermeiden.
Erste mechanische und chemische Methoden (Übersicht: Ref. 89) lieferten nur Suspensionen von zerstörten Zellen. Erst durch Berry und Friend (90,91), die die bekannte Methode der Leberperfusion mit der von Howard et al. (92) entwickelten Collagenasedispersion kombinierten, wurde es möglich, große Mengen intakter Leberzellen zu präparieren.

In der Folge wurden diese Grundlagen ausgebaut, wobei jedes Labor seine eigene Variante der Präparation entwickelte, die sich an den Fähigkeiten des Experimentators und anderen zu untersuchenden biochemischen Parametern orientierte.
Trotz einer Vielzahl kleinerer und größerer Unterschiede haben diese Varianten gewisse prinzipielle Gemeinsamkeiten:

a) die von Seglen (93) entwickelte Methode der Zweistufenperfusion, bestehend aus einer Perfusion, die Calcium aus der Leber herauswäscht und einer anschließenden organdispergierenden Perfusion mit Collagenase und Calcium,
b) eine mechanische Dissoziation der durch die Organdispersion anfallenden Hepatocytenverbände,
c) die Isolierung einer reinen Parenchymzellfraktion aus dem Gemisch der verschiedenen Zelltypen in der Primärsuspension.

Trotz dieser Gemeinsamkeit im prinzipiellen Vorgehen bei der Isolation und auch trotz des Einsatzes hochentwickelter Technik (Perfusionsapparate) in manchen Laboratorien muß noch heute festgestellt werden (87): "The successful preparation of intact liver cells by perfusion with collagenase is technically quite difficult and still remains mostly an art".

Entscheidend für die Verwendung als experimentelles System ist die Frage, in wieweit die Zellen die metabolische Situation "in vivo" reflektieren.
Untersuchungen der Ultrastruktur (87,88,90,92,94-106) zeigten eine große Übereinstimmung mit der Struktur im Gewebeverband. Ausnahmen stellen die runde Form und die zahlreichen Mikrovilli der Plasmamembran dar. Dies wurde als Zeichen für den Verlust der ursprünglich vorhandenen spezialisierten Membranregionen (blutsinusoidal, canalicular und lateral) gedeutet. Dagegen konnten Wisher und Evans (107-109) in Plasmamembranfraktionen isolierter Hepatocyten eine ähnliche Heterogenität wie in der Leber selbst nachweisen, was für eine Präservation der Oberflächenregionen spricht. Diese Ansicht wird auch von anderen Autoren geteilt (110-112), die die Fähigkeit der isolierten Hepatocyten zur Sekretion von Albumin, Fibrinogen und Gallensäuren beschreiben, Prozesse, die an verschiedenen Stellen der Oberfläche von Hepatocyten im Gewebeverband ablaufen.

Eine charakteristische Rolle spielt die Leber im Kohlehydratstoffwechsel. Isolierte Hepatocyten scheinen diesbezügliche Fähigkeiten präserviert zu haben. So werden die glukoneogenetischen Eigenschaften der isolierten Zellen ausgehend von Laktat, Pyruvat, Glycerin und Aminosäuren mehrfach beschrieben (90,113-123), wobei eine Glukoneogeneserate von 50-90% des "in vivo"-Wertes gefunden wurde.

Diese gute Übereinstimmung legt die Verwendung isolierter Hepatocyten als System zur Untersuchung der Regulation der Glukoneogenese nahe.
So zeigten Untersuchungen der hormonalen Regulation des Kohlehydratstoffwechsels (124-126), daß Glukagon die Glykogenolyse sowie die Glukoneogenese stimuliert (117,118,127) und die Glykogensynthese und die Glykolyse inhibiert (128).

Widersprüchliche Daten liegen über die Wirkung von Insulin vor: Seglen (129) bezeichnete die von Johnson et al. (117) publizierten Insulineffekt als Artefakt. Andere Hormonstudien (66,67,97,96,123,127,134), besonders die von Veneziale et al. (135) und Fain et al. (136,137) lassen die Anwesenheit von Insulin-, Adrenalin-, Glukagon- und Concanavalin A-Rezeptoren in der Plasmamembran von isolierten Hepatocyten gesichert erscheinen. In einer neueren Arbeit wird der Transport von Trijodthyronin in die Zellen beschrieben (138).

Wohl die meisten Arbeiten an isolierten Hepatocyten beschäftigen sich mit dem Proteinmetabolismus (87,89,94, 98-100,102,106,113,139-155). Das Potential isolierter Leberparenchymzellen erstreckt sich dabei von der RNA-Synthese über die Proteinsynthese bis hin zur Proteindegradation und zur Abgabe von Aminosäuren und Harnstoff ins Medium. Besondere Aufmerksamkeit wurde der Kinetik des Einbaus radioaktiver Aminosäuren in Zellprotein gewidmet. Sie wird in manchen Arbeiten als linear über eine (102), zwei (113), vier (94) oder sechs Stunden (96) beschrieben. In letzterem Fall muß die Signifikanz wegen der unzureichenden Integrität der Zellen (40-70%) bezweifelt werden. Andere Autoren finden eine Sättigungskinetik über eine (89,151, 143) oder drei Stunden (139). Diese Diskrepanz läßt sich auf die Eigenschaft der Zellen, Aminosäuren ins Medium abzugeben, zurückführen.

(151), wodurch die spezifische Aktivität der radioaktiven Aminosäure bei entsprechenden Inkubationsbedingungen verringert wird.

Bis vor kurzem wurde angenommen, isolierte Leberzellen seien frei permeabel für Aminosäuren (87,89) wie auch für Hexosen (87).
Dies trifft zumindest für Fruktose (156), Glukose und Galaktose (160,161) nicht zu, deren entsprechende Carriersysteme nachgewiesen wurden. Obwohl die freie Diffusion von Aminosäuren bis heute noch nicht widerlegt wurde, scheint sie zumindest nicht die ausschließliche Möglichkeit zur Überwindung der Plasmamembran darzustellen, wie verschiedene Autoren (162,163) zeigten. So beschrieben McGivan et al. (164) neben einem gemeinsamen Leucin-, Isoleucin- und Valintransportsystem auch die passive Permeation der Aminosäuren. Andere Autoren fanden daneben auch hormoninduzierbare Aminosäuretransportsysteme (157,159,163,165,166).
Neben der Regulation des Kohlehydratestoffwechsels ist die Synthese von Plasmaproteinen eine wesentliche Aufgabe der Leber.
In isolierten Hepatocyten konnte nicht nur die Synthese von Albumin (139,167), sondern auch dessen Sezernierung ins Medium (141) gezeigt werden. Neuerdings wurde durch Immunpräzipitation die Demonstration eines Precursors des Albumins möglich (142,147). Feldhoff et al. (168) bestimmten die Synthese- und Sekretionsrate des Albumins auf etwa 59% des "in vivo"-Wertes. Der Nachweis der Synthese von Fibrinogen (111) wurde schon erwähnt. Daneben wurde auch die Bildung von Tryptophanoxygenase (169), der Fettsäuresynthetase (170) und der d-Aminolaevulinsäuresynthetase (171) beschrieben.
Insgesamt macht die Synthese von Plasmaproteinen über 50% der Gesamtproteinsynthese aus (96), die durch Cyclo-

heximid und Puromycin, in höheren Dosen auch durch Chloramphenicol und Streptomycin hemmbar ist (89).

Wenig bekannt ist die Rate für die Gesamtproteinsynthese. Wagle (172) beziffert sie auf 3 mg Protein/g Feuchtgewicht x Stunde. Sie liegt damit deutlich unter dem "in vivo"-Wert (9 mg Protein/gxh) (173).
Auch bezüglich des Proteinkatabolismus zeigen die isolierten Zellen ein vom Organ abweichendes Verhalten: nach Seglen (146,151) weisen isolierte Zellen einen Stickstoffverlust von 3-4% des Zellproteins pro Stunde auf. Dabei soll die Proteinsyntheserate vernachlässigbar sein (146). Dieser allgemeine proteinkatabole Zustand läßt sich teilweise durch Zusatz von Ammoniumchlorid aufheben (145,147). Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Hopgood et al. (174).

Die Wirkung von Ammoniumchlorid könnte nach Tager und Seglen (145,175) auf einer Inhibition der sauren Proteasen des lysosomalen Systems durch die schwache Base NH_4Cl beruhen.

Im Gegensatz zum Proteinstoffwechsel ist der Lipidmetabolismus Gegenstand nur weniger Untersuchungen geworden.

Während Zellen von gefütterten Ratten hauptsächlich Fettsäureester bilden, transformieren Zellen gehungerter Tiere freie Fettsäuren zum überwiegenden Teil in Ketonkörper (94,176-178), wobei die Rate der Ketonkörperbildung aus verschiedenen Substraten mit der "in vivo"-Rate nahezu identisch ist (123).

Will man zusammenfassend die Ausgangsfrage nach der biologischen Kompetenz isolierter Leberzellen beantworten, so zeigt sich (unter Berücksichtigung weiterer Kriterien wie Atmung (123) und Drogenmetabolismus (179)) eine recht gute Übereinstimmung mit dem Organ "in vivo".

Eine Ausnahme bildet dabei offensichtlich der Proteinmetabolismus, der in die katabole Richtung verschoben zu sein scheint. Dies könnte auf einen Defekt in der Regulation zurückzuführen sein.
Bei einer Wertung darf man allerdings nicht außer acht lassen, daß bisher nur eine begrenzte Zahl der bekannten Leberfunktionen untersucht worden ist.
Im Hinblick auf das Vorhaben, die Biosynthese der Cytochromoxidase zu untersuchen, ist ein anderes Ziel dieser Arbeit in der Isolierung von Rattenleberparenchymzellen zu sehen, die über einen längeren Zeitraum eine intakte Proteinsynthese aufweisen, deren Charakterisierung einen Vergleich mit dem Organ gestatten sollte.

II Material und Methoden

1. Material

Tiere:

a) männliche Wistar-Ratten (Tierzucht Brünger, Halle-Bockel) Gewicht 140-450 g

b) Alaska-Kaninchen (Tierstall des FB Biologie, Universität Marburg) ca. 3 kg
Kaninchen (Tierstall des FB Humanmedizin, Universität Marburg) ca. 3 kg

Hemmstoffe:

Cycloheximid (Sigma, St. Louis)
Phenylmethylsulfonylfluorid (Serva, Heidelberg)
Chloramphenicol (Boehringer, Mannheim)
Emetin (Boehringer, Mannheim)
Penicillin (Serva, Heidelberg)
Streptomycin (Serva, Heidelberg)
Thiocid (=Thiomerosal) (Serva, Heidelberg)

Radioaktive Verbindungen:

L-(4,5-^{3}H)-Leucin (ca. 50 Ci/mMol, 1 mCi/ml)
L-(U -^{14}C)- Leucin (ca. 300 mCi/mMol, 1 mCi/ml)
L-(methyl-^{3}H)-Methionin (ca. 10 Ci/mMol, 1 mCi/ml)
L-(^{35}S)-Methionin (ca. 600 Ci/mMol, 2 mCi/ml)
alle von Amersham-Buchler, Braunschweig

Chemikalien für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

Acrylamid
N,N-Methylenbisacrylamid
N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
alle von Serva, Heidelberg

Eichsubstanzen:

Rinderserumalbumin (Serva, Heidelberg)
Glutamatdehydrogenase
Aldolase

Carboanhydrase
Cytochrom c
alle von Boehringer, Mannheim

Detergentien:
Natriumdodecylsulfat (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn)
Triton X-100 (Serva, Heidelberg)
Tween-80 (Serva, Heidelberg)

Chemikalien für Ouchterlony-Test:
Agarose puriss. (Behringwerke, Marburg)
Agarose C (Pharmacia, Freiburg)

Material zur Säulenchromatographie:
QAE-Sephadex G-50
Sephadex G-50
beide von Pharmacia, Freiburg

Chemikalien zur Isolierung und Inkubation von Hepatocyten:
Collagenase Typ II CLS (Worthington über Fa. Roth, Karlsruhe)
Hyaluronidase Typ I (Sigma, St. Louis)
Heparin (Roth, Karlsruhe)

Chemikalien zur Szintillationszählung:
"Rotiszint" Szintillationsflüssigkeit auf Toluolbasis mit Triton X-100 (Roth, Karlsruhe)

Alle nicht genannten Chemikalien waren vom Reinheitsgrad p. a. und stammen entweder von Merck, Darmstadt, von Fluka, Buchs, SG oder von Riedel de Haen, Hannover. Wässrige Lösungen wurden stets mit quarzdestilliertem Wasser hergestellt.

2. Methoden

2.1. Herstellung isolierter Rattenleberzellen

Die in dieser Arbeit entwickelte Technik lehnt sich an Arbeiten von Seglen (87,93) und Schreiber (89) an.

2.1.1. Operationstechnik

Unter Ätheranästhesie werden die Extremitäten der Ratte auf dem Operationstisch fixiert. Um eine Blutgerinnung zu vermeiden, werden 0,1 ml 0,02% Heparin in isotoner Kochsalzlösung in die V. femoralis injiziert. Danach wird das Abdomen geöffnet, wobei eine Durchtrennung des Diaphragmas vermieden werden muß. Die V. cava inferior und die V. portae werden isoliert. Zwei lose Schleifen (mit Zwirn) werden um die V. portae gelegt, eine anterior zur Mündung der V. mesenterica superior und eine direkt posterior zur Mündung der V. lienalis. Eine dritte Schleife legt man um die V. cava inferior zur Mündung der V. renalis dexter.
Die folgenden Arbeiten wurden so rasch wie möglich durchgeführt.
In die V. portae wird zwischen den beiden Schleifen ein Einschnitt gemacht, eine Kanüle eingeführt und durch die kraniale Schleife fixiert. Nach dem Austritt von einigen Tropfen Blut wird die Kanüle an das Perfusionsmedium angeschlossen, das sofort unter geringem Fluß in die Leber eintritt und sie etwas zum Schwellen bringt. Sofort wird die V. cava inferior unterhalb der rechten Niere caudal zur Schleife geöffnet. Dadurch wird ein Ausgang für das aus der Leber austretende Perfusionsmedium geschaffen, die Schwellung der Leber geht zurück. Danach kann die Flußgeschwindigkeit auf 50 ml/Min. gesteigert werden.

Der Thorax wird geöffnet und eine lose Schleife um die V. cava inferior etwas oberhalb der Austrittsstelle aus dem Diaphragma gelegt. Ein kleiner Schnitt in die Vene kranial zur Schleife ermöglicht die Insertion einer Kanüle, die dann durch die Schleife fixiert wird. Jetzt wird die Schleife um die V. cava inferior im Abdominalraum zugezogen, wodurch der Abfluß des Perfusats durch die thorakale Kanüle erzwungen wird.

2.1.2. Perfusion und Perfusionsapparatur

In Anlehnung an die Zweistufentechnik von Seglen (87) wird zunächst mit einem calciumfreien Medium vorperfundiert, wobei die Leber zunächst blutfrei gewaschen wird.
Vorperfusionsmedium (in Anlehnung an Hanks et al. (181)):

NaCl	8,0 g/l
KCl	4,0 g/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	2,0 g/l
$Na_2HPO_4 \times 12\ H_2O$	1,2 g/l
KH_2PO_4	0,6 g/l
Glukose	10,0 g/l
$NaHCO_3$	3,5 g/l
pH	7,6

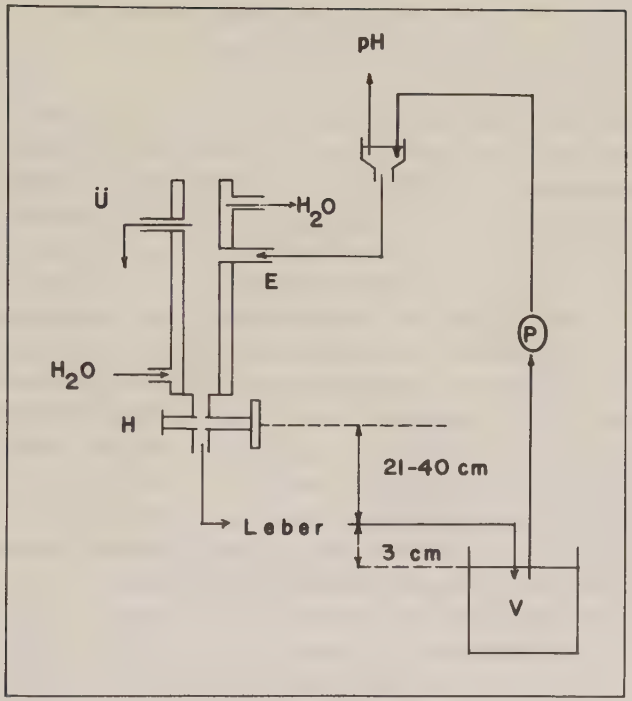
Die Wirkung des Entzugs von Calciumionen auf das Lebergewebe ist irreversibel (87) und besteht wahrscheinlich in einer Konversion von Desmosomen in Hemidesmosomen (105). Bei der Vorperfusion sollte ein Fluß von 50 ml/Min. genügen, um die Leber adäquat mit Sauerstoff zu versorgen, selbst wenn das Medium nicht mit Carbogen begast wird.

Nach 10 Minuten wird das Vorperfusionsmedium durch das Perfusionsmedium ersetzt.
Perfusionsmedium:
Das Perfusionsmedium schließt die im Vorperfusionsmedium enthaltenen Stoffe ein und enthält außerdem:

$CaCl_2$	0,14	g/100 ml
Rinderserumalbumin Fraktion V	2,0	g/100 ml
Collagenase	50,0	mg/100 ml
(Hyaluronidase	80,0	mg/100 ml)
pH	7,5	

Das die Leber verlassende Perfusionsmedium wird im Gegensatz zum Vorperfusionsmedium in das Vorratsgefäß zurückgeleitet, wo es von neuem in den Kreislauf eintritt.
Das Perfusionsmedium enthält als wesentlichen Bestandteil Collagenase, bei anfänglichen Experimenten auch Hyaluronidase. Die Verwendung von Hyaluronidase wurde nach wenigen Experimenten eingestellt, da dem Enzym neuerdings eine negative Wirkung auf die Ultrastruktur zugeschrieben wird (87).
Um die hydrostatische Belastung der Leber zu reduzieren, wird die Flußrate des Mediums auf 30 ml/Min. verringert. Dies wird einfach durch Anheben der Ratte erreicht.
Nach 15-20-minütiger Perfusion fängt die Leber sichtlich an zu schwellen, das Medium läuft von der Oberfläche der Leber ab und das Organ hat seine ursprüngliche Festigkeit verloren. Vorsichtig und rasch wird die Leber aus dem Abdominalraum herausgetrennt und die Perfusion beendet.

Der Aufbau der Apparatur ist auf der folgenden Seite wiedergegeben.
Das Perfusionsmedium wird in einem Vorratsgefäß (V) auf 37°C vorgewärmt. Mittels einer Schlauchpumpe (P) gelangt das Medium in ein Reduzierstück, das als Luftblasenfalle wirkt. Hier wird auch der pH registriert und eventuell nachjustiert. Das Reduzierstück ist mit einem abgewandeltenTropftrichter verbunden, dessen Ummantelung eine Thermostatisierung des Mediums auf 37°C erlaubt. Die im Schema wiedergegebene Anordnung von Einlaß (E) und Überlauf (Ü) bewirkt eine Entfernung auch kleinerer Luftblasen, die sonst häufig mit dem Perfusionsmedium (dick-



flüssig durch Albumin) in die Leber gelangen und dort die Venülen verstopfen.
Aus dem Tropftrichter gelangt das Medium direkt über eine Schlauchverbindung in die ca. 40 cm tiefer gelegene Leber. Durch eine entsprechende Justierung des Hahns (H) wird ein Fluß von ca. 50 ml/Min. für die Vorperfusion eingestellt, der sich durch Anheben der Ratte um 19 cm auf ca. 30 ml/Min. während der Perfusion reduziert.

Beim Austritt aus der Leber sollte der negative hydrostatische Druck nicht mehr als ca. 3 cm Wassersäule betragen.

2.1.3. Liberation und Dispersion der Zellen

Nachdem die Leber aus dem Abdomen herauspräpariert ist, wird sie in einem 250 ml Plastikbecher, der 50 ml Vorperfusionsmedium enthält, mit der Schere in kleinere Stücke zerschnitten. Diese, sowie die folgenden Arbeiten werden bei $0^{o}C$ bis $4^{o}C$ durchgeführt.
Um alle Zellen aus dem Gewebe freizusetzen und die meist vorliegenden Zellhaufen in Einzelzellen zu dispergieren, muß die vorliegende Suspension ca. 5 Min. lang mit einem Spatel per Hand vorsichtig umgerührt werden. Die so erhaltene "Primärsuspension" wird durch ein Gaze-Filter mit ca. 1,4 mm Maschenweite filtriert, wobei größere, unvollständig perfundierte Leberteile und eventuell anhaftendes Bindegewebe zurückgehalten werden. Eine zweite Filtration, unterstützt durch gelegentliche Zugabe von kleineren Mengen Medium durch ein Gaze-Filter mit ca. 0,4 mm Maschenweite schließt sich an. Dadurch werden größere Zellaggregate abgetrennt.

2.1.4. Isolierung der Hepatocytenfraktion aus dem Zellgemisch

Da Nichtparenchymzellen wesentlich kleiner und zerstörte Parenchymzellen viel leichter als intakte Parenchymzellen sind, können erstere durch Differentialzentrifugation entfernt werden.
Die Primärsuspension wird bei 60 g_{max} (= 700 rpm, Sorvallzentrifuge, Rotor SS 34) abzentrifugiert, das Sediment in Vorperfusionsmedium aufgenommen und bei 50 g_{max} (= 650 rpm) erneut abzentrifugiert. Dieser Vorgang

wiederholt sich zweimal, bevor das Zellsediment im Inkubationsmedium aufgenommen wird (Sekundärsuspension).

Inkubationsmedien:

a) in Anlehnung an Schreiber (89)

KCl	65,0	mM
$MgSO_4$	3,5	mM
$CaCl_2$	2,5	mM
NaCl	71,0	mM
NaH_2PO_4/Na_2HPO_4	6,16	mM
Glukose	1,0	%
Heparin	0,02	%
Penicillin	0,025	%
Streptomycin	0,025	%

und ein Aminosäuregemisch

Die einzelnen Aminosäuren erreichten folgende Endkonzentrationen:

Ala	900 µM	Leu	71 µM
Arg	517 µM	Lys	150 µM
Asn	443 µM	Met	51 µM
Asp	670 µM	Phe	316 µM
Cys	87 µM	Pro	287 µM
Glu	450 µM	Ser	746 µM
Gly	610 µM	Thr	270 µM
His	449 µM	Tyr	500 µM
Ile	28 µM	Val	190 µM
pH	7,6 (87)		

b) Phosphatpuffer nach Krebs-Ringer (184)

NaCl	120,3 mM
KCl	4,8 mM
$CaCl_2$	2,6 mM
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1,2 mM
Phosphatpuffer	15,6 mM
Glukose	1,0 %
pH	7,6

c) Carbonatpuffer nach Krebs-Ringer (184)

NaCl	120,3 mM
KCl	4,8 mM
$CaCl_2$	2,6 mM
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	1,2 mM
$NaHCO_3$	25,0 mM
KH_2PO_4	1,2 mM
Glukose	1,0 %
pH	7,6

2.1.5. Bestimmung der Zellintegrität mit Trypanblau

Zellen mit einer intakten Zellmembran sind für Farbstoffe wie Trypanblau, Eosin oder Nigrosin impermeabel, während sich lädierte Zellen anfärben lassen (besonders intensiv der Zellkern).
Ein Volumenteil Zellsuspension wird mit einem Teil Trypanblau (1% in Vorperfusionsmedium) mindestens 15 Min. inkubiert. Nach dieser Zeit kann die Integrität im Lichtmikroskop beurteilt werden.
In der Regel konnte auf diese Weise bei 5-20% der frisch isolierten Zellen, nach einer Inkubation von 8 Stunden bei 10-30% eine Anfärbung registriert werden.

2.2. Inkubation isolierter Rattenleberzellen

2.2.1. Apparatur und Gefäße

Es wurde ein Schüttelthermostat (Braun, Melsungen) verwendet, in dem bis zu 33 Proben gleichzeitig bei 37°C inkubiert wurden (Zellen im Inkubationsmedium). Falls Szintillationsgläschen (Füllvolumen ca. 2 ml) als Inkubationsgefäße dienten, betrug die Frequenz bei reziproker Schüttelart 120/Min., im Falle von 500 ml Erlenmeyer-

kolben (Füllvolumen ca. 20 ml) betrug die Frequenz 60/ Min.. Der Probenraum wurde abgedeckt, so daß sich das Probenvolumen infolge von Verdunstung kaum veränderte.

2.2.2. Begasung mit Carbogen

In manchen Experimenten wurden die Proben während der Inkubation mit Carbogen begast. Das Gas wurde vor dem Eintritt in das Inkubationsgefäß zwecks Reinigung und Befeuchtung durch zwei mit Wasser gefüllte Gaswaschflaschen geleitet. Als Inkubationsgefäße dienten dann Erlenmeyerkolben mit Schliff, die mit einem Waschflaschenaufsatz verschlossen wurden.

2.3. Einbau radioaktiver Aminosäuren in Protein

2.3.1. Inkubation

Von der Sekundärsuspension wird eine definierte Menge in die Inkubationsgefäße pipettiert. In der Regel werden dann die Zellen 5 Minuten vorinkubiert. Danach wird durch Zugabe der radioaktiven Aminosäure der Einbau in Protein gestartet (die jeweils zugegebene radioaktive Aminosäure fehlte im Aminosäuregemisch des Inkubationsmediums).

2.3.2. Beendigung der Inkubation

Bei Proben zur Bestimmung des Einbaus in Gesamtprotein:
Die Inkubation wird durch Denaturierung des Proteins durch Zusatz von Trichloressigsäure oder Perchlorsäure (50 µL 3 M TCA oder $HClO_4$ auf 2 ml Probenvolumen) beendet.
Bei Proben für immunologische Untersuchungen:
Die Proben werden in Eiswasser abgekühlt und gleichzeitig mit eiskaltem Inkubationsmedium versetzt, das die

entprechende unmarkierte Aminosäure in hoher Konzentration (10 mM) enthält. Es wird zentrifugiert (10 Min. bei 700 rpm, Sorvallzentrifuge, Rotor SS 34) und anschliessend mehrmals mit dem gleichen Medium gewaschen.

2.4. Vorbereitung der Proben zur Radioaktivitätsmessung

2.4.1. Säuredenaturierte Proben

Nach der Fällung mit TCA oder $HClO_4$ wird das Protein abzentrifugiert. Das Sediment wird in 5 ml 0,3 M TCA aufgenommen und 30 Min. auf 90°C erwärmt, wodurch Nukleinsäuren entfernt werden. Nach erneutem Zentrifugieren werden Lipide extrahiert, indem das Sediment zweimal mit Methanol/Aceton (1:2) gewaschen wird. Lösungsmittelreste werden im Trockenschrank abgedampft und das trockene Sediment in 0,5 ml 0,1 M NaOH gelöst. 50 µl der Lösung werden weitgehend neutralisiert (wegen der Baseninstabilität der Szintillationsflüssigkeit), mit Wasser auf 0,9 ml aufgefüllt und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt.
Weitere 50 µl der alkalischen Proteinlösung dienen zur Proteinbestimmung.

2.4.2. Gelschnitte

Gelschnitte werden mindestens 36 Stunden bei 50°C in 0,6 ml 0,5% SDS-Lösung geschüttelt. Nach dem Abkühlen wurden die Proben mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt.

2.4.3. Detergensgelöste Proben

Ein Aliquot detergensgelöster Proben wurde mit Wasser auf 0,9 ml aufgefüllt und mit Szintillationsflüssigkeit gemischt.

2.5. Radioaktivitätsmessung

Radioaktivität wurde in einem Szintillationspektrometer der Fa. Berthold, Bad Wildungen gemessen. Die Zählausbeute betrug in der Regel für ^{3}H-markierte Proben 20-24%, für ^{14}C-markierte Proben ca. 80 - 90%, während die Zählausbeute für ^{35}S-markierte Proben bei 70-75% lag. Die Zählausbeute bei der Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf Gelen lag etwas niedriger, bedingt durch erhöhten Quench durch das anwesende Acrylamid in der Probe.

2.6. Proteinbestimmungen

Protein wurde entweder nach einer modifizierten Biuret-Methode (185) oder nach Lowry (186) mit Rinderserumalbumin als Standard bestimmt.

2.7. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Gelröhrchen:
Im allgemeinen wurden Glasröhrchen von 15 cm Länge und 0,4 cm Innendurchmesser verwendet, die zuvor einer sorgfältigen Reinigung in Chromschwefelsäure unterzogen wurden.
Lösungen:
a) System nach Weber und Osborn (187) mit Modifikationen nach Hofmann (188) :

Elektrodenpuffer	75,0	mM Na-Phosphat pH 7,8
	0,1	% SDS
Trenngel	75,0	mM Na-Phosphat pH 7,8
	0,1	% SDS
	10,0	% Acrylamid
	0,27	% Bis
	0,033	% TEMED
	0,04	% Ammoniumpersulfat

Sammelgel	20,0	mM Na-Phosphat pH 6,8
	0,1	% SDS
	3,0	% Acrylamid
	0,08	% Bis
	0,1	% TEMED
	0,04	% Ammoniumpersulfat
Probenpuffer	10,0	mM Na-Phosphat pH 6,8
	1,0	% SDS (vor Gebrauch Zugabe von
	5,0	% Mercaptoäthanol)

b) System nach Swank-Munkres (189) mit Modifikationen von Downer et al. (32):

Elektrodenpuffer	0,1	M H_3PO_4/Tris pH 6,8
	0,1	% SDS
Trenngel	0,1	M H_3PO_4/Tris pH 6,8
	8,0	M Harnstoff
	0,1	% SDS
	10,0	% Acrylamid
	0,27	% Bis
	0,033	% TEMED
	0,07	% Ammoniumpersulfat
Probenpuffer	0,01	M H_3PO_4/Tris pH 8,3
	8,0	M Harnstoff
	4,0	% SDS

Für beide Systeme:

Färbelösung	1,25	g Coomassie Blue G
	454,0	ml Methanol
	46,0	ml Eisessig
Entfärbelösung	50,0	ml Methanol
	75,0	ml Eisessig
	875,0	ml H_2O

Polymerisation:

Um Luftblasen und Risse im Gel zu vermeiden, war eine Deaeration der Gellösung unerläßlich. Dazu wurde die

die Gellösung am Rotavapor bei Wasserstrahlvakuum mindestens 20 Minuten lang entgast.
Die Polymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat gestartet, die Gellösung bis zu einer Höhe von ca. 12 cm in die Röhrchen eingefüllt und sofort mit einer peristaltischen Pumpe mit Wasser überschichtet. Die Polymerisation war nach ca. 40 Minuten beendet.
Bei Gelen nach dem System Weber-Osborn wurde am nächsten Morgen ein ca. 1 cm hohes Sammelgel aufpolymerisiert. Ein Stehenlassen über Nacht erwies sich bei Harnstoffgelen als unvorteilhaft, so daß diese unmittelbar nach der Polymerisation verwendet wurden.
Vorbereitung der Proben und Durchführung der Elektrophorese:
Proteinlösungen (50-200 µl Protein in 5-20 µl) wurden mit 50 µl Probenpuffer mindestens 1 Stunde (Immunsedimente mindestens 14 Stunden) bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Aliquot der Lösung wurde zur Proteinbestimmung, ein anderes Aliquot zur Radioaktivitätsmessung und der Rest schließlich (mit Mercaptoäthanol auf 5%, Bromphenolblau auf 10% und 1 Tropfen Glycerin versetzt und mindestens 1 Stunde inkubiert) zur Elektrophorese verwendet.
Für Gele nach Weber-Osborn betrug die Stromstärke während des Einlaufens ins Sammelgel 2 mA/Gel, während des Laufes im Trenngel 7-8 mA/Gel.
Bei Harnstoffgelen betrug die Stromstärke während des Einlaufens (30 Minuten) 1,5 mA/Gel, während der Trennung 2,5 mA/Gel.
Die Trennung wurde beendet, wenn die Bromphenolblaubande ca. 1,5 mm vom unteren Gelende entfernt war. Die Gele wurden mit Wasserdruck aus den Röhrchen gepresst, ca. 1 Stunde in die Färbelösung gelegt und anschließend im Entfärbebad 1-2 Tage entfärbt. Danach war der Untergrund in der Regel völlig entfärbt, so daß die Banden bei 578 nm am Eppendorf-Photometer (umgebauter Pherogramm-

auswerter 2602, Fa. Eppendorf, Hamburg) registriert werden konnten.

Eichung der Gele :

Die SDS-Gelelektrophorese ist eine weitverbreitete Methode zur Bestimmung von Molekulargewichten aufgrund relativer Mobilitäten.

Die relative Mobiliät (rel. Mob.) von Banden ergibt sich aus :

$$\text{rel. Mob.} = \frac{BS}{FS} \times \frac{GF}{GE}$$

wobei: BS = Entfernung der Bande vom Start
FS = Entfernung des Farbstoffs (Bromphenolblau) vom Start
GF = Gellänge vor dem Färben
GE = Gellänge nach dem Entfärben

Eine Molekulargewichtsbestimmung auf der Basis relativer Mobilitäten ist durch den Vergleich mit relativen Mobilitäten von Eichproteinen möglich :

Rinderserumalbumin	MG 68 000
Glutamatdehydrogenase	MG 53 000
Aldolase	MG 40 000
Carboanhydrase	MG 24 000
Myoglobin	MG 17 500
Cytochrom c	MG 12 000

Herstellung von Gelschnitten zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung auf Gelen :

Nach der Elektrophorese wurden die Gelröhrchen in einen Gelschneider der Fa. Gilson eingespannt. Bei einem Vorschub von 1 mm wird das Gel durch ein engmaschiges Sieb gepresst und dadurch weitgehend homogenisiert. Eine Pumpe spült in mehreren Hüben das Homogenat mit ca. 200 µl Wasser in die Szintillationsgefäße.

Weitere Behandlung s. 2.4.2. und 2.5.

2.8. Immunologische Untersuchungen

Für die Immunisierung von Kaninchen bin ich Herrn Prof. Dr. Kirchner (FB Biologie) und Herrn Dr. habil. Radsack (FB Humanmedizin), diesem außerdem auch für die Bereitstellung von Antiserum (A) sehr zu Dank verpflichtet.

2.8.1. Immunisierungen

2.8.1.1. Immunisierung Methode A (Dr. Radsack)

Es wurden drei Kaninchen gleichzeitig immunisiert.

Injektionslösung: 10 mg% CytOx in isotoner NaCl-Phosphatlösung
0,05 % Al $(OH)_3$

Injektionsschema (pro Tier) :

1. Woche	3x1 ml	i.p., i.v., i.m.
2. Woche	3x1,5 ml	i.p., i.v., i.m.
3. Woche	4x2 ml	i.p., i.v., i.m., s.c.
4. Woche	4x3 ml	i.p., i.v., i.m., s.c.
5. Woche	2x5 ml	i.p., s.c.

Nach dieser Zeit wurden den Tieren je ca. 10 ml Blut entnommen und das Serum auf Antikörper gegen Cytochromoxidase im Ouchterlony-Test geprüft.
In zweiwöchentlichen Abständen folgten Blutentnahmen von je ca. 20 ml.
In der dazwischenliegenden Woche wurde jeweils mit 2 ml Injektionslösung geboostert.

2.8.1.2. Immunisierung Methode B (Prof. Kircher)

Injektionslösung: 1 mg Cytochromoxidase (3,6 mg/ml) + Freund's Complete Adjuvans im Verhältnis 1:1

Injektionsschema:

1. bis 4. Woche wöchentlich 1x1 mg Oxidase (= 0,55 ml Injektionslösung)

In der 5. Woche erfolgte eine Blutentnahme zum Austesten auf Antikörper gegen Cytochromoxidase. Danach wurde in vierzehntägigem Abstand mit je 1 mg Enzym geboostert, wobei die Injektionslösung Freund's Incomplete Adjuvans enthielt.

Nach 8 Wochen wurde das Tier entblutet.

2.8.2. Herstellung von Anti-Cytochromoxidaseserum

Zur Gerinnung stand das Kaninchenblut ca. 4 Stunden bei Zimmertemperatur und mindestens weitere 6 Stunden bei 0°C. Der Blutkuchen wurde mit einem Tropftrichter, restliche Erythrocyten durch Zentrifugation (10Minuten, 6000 rpm, Sorvall SS 34) abgetrennt. Falls eine Lagerung vorgesehen war, wurde das Serum mit Natriumazid auf 0,02% versetzt.

2.8.3. Präparation der IgG B-Fraktion

Die Isolierung der IgG B-Fraktion erfolgte in Anlehnung an Arbeiten von Joustra et al. (190) und Kirchner et al. (191). Das Serum wurde zunächst zweimal mit eiskaltem Äther ausgeschüttelt, um Lipoproteine zu entfernen, die die Kapazität des Anionenaustauschers wesentlich herabsetzen. Alle folgenden Arbeiten wurden bei 0°C durchgeführt.

Das Serum B (ca. 15 ml) wird im Volumenverhältnis 1:1 mit Elutionspuffer verdünnt und auf eine Anionenaustauschersäule (QAE-Sephadex G-50) aufgetragen.

Säulendimensionen	30 x 1,5 cm
Elutionspuffer	Äthylendiamin/Acetat pH 7,0 (I = 0,1) 0,02% Natriumazid
Flußgeschwindigkeit	12 ml/h

Die Elution des Proteins wurde durch Registrierung der Transmission bei 280 nm mit einer LKB Uvicord III-Einheit verfolgt.
Die IgG-Fraktion erscheint zusammen mit Hämoglobin an der Front des Eluats. Das Eluat wird durch Vakuumdialyse gegen Elutionspuffer auf das ursprüngliche Volumen eingeengt und auf eine Sephadex G-150-Säule aufgetragen.

Säulendimensionen	70 x 1,5 cm
Elutionspuffer,	
Flußgeschwindigkeit	s. QAE-Säule

Auf dieser Säule wird das Hämoglobin von der IgG-Fraktion abgetrennt. Die mit der Front eluierte IgG-Fraktion wird erneut durch Vakuumdialyse auf das ursprüngliche Volumen ankonzentriert und schließlich lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bei -18°C gelagert.
Die Regenerierung der QAE-Säule erfolgte durch Waschen mit 1 Säulenvolumen Acetatpuffer pH 4,0 (I=0,1) und anschließend durch Äquilibrierung mit Elutionspuffer.

Die Sephadex G-150-Säule ist nach der Elution des Hämoglobins sofort wiederverwendbar.
Auf die beschriebene Weise konnten aus 40 ml Serum ca. 509 mg Immunglobulin isoliert werden.
IgG H wurde freundlicherweise von Frl. Hundt nach der oben beschriebenen Methode isoliert und zur Verfügung gestellt.

2.8.4. Doppeldiffusionstest

Zur Überprüfung der Spezifität der Antisera und der IgG-Fraktionen wurde der Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (192,193) verwendet.

Puffer	20,0 mM Na-Phosphat pH 7,2
	150,0 mM NaCl
	1,0 % Triton X-100

99 ml Puffer werden im Wasserbad auf ca. 80°C erhitzt. Diese Temperatur wird beibehalten während 1 g Agarose in kleinen Portionen in den Puffer eingerührt werden. Nach ca. 20 Minuten läßt man die Gellösung auf ca. 45-50°C erkalten, setzt 90 mg Thiocid zu und trägt ca. 3 ml auf die sorgfältig in Chromschwefelsäure gereinigten Objektträger auf. Nach dem Erkalten stanzt man mit Hilfe einer Schablone 2 Rosetten zu 6 Löchern mit Zentralloch in das Gel. Die Löcher hatten einen Durchmesser von 6 mm und einen Abstand zum Zentralloch von 4 mm. Nach dem Ausheben der Löcher (in der Regel zugleich mit dem Stanzen) wird eine kleine Menge Agarose in 3 ml Wasser gelöst. Von dieser Lösung gibt man je ca. 2 µl in jedes Loch. Dadurch wird der Spalt zwischen Agargel und Objektträger abgedichtet (194). Das Fassungsvermögen der Löcher beträgt ca. 20 µl.
Ouchterlony-Tests von IgG H wurden von Frl. Hundt durchgeführt.
Die beschickten Objektträger werden in einer feuchten Kammer bei 4°C mit Wasserdampf äquilibriert und aufbewahrt. Zwei bis vier Tage nach dem Füllen der Stanzlöcher mit Antigen und Antikörper konnten die Präzipitationslinien erkannt werden. In manchen Fällen wurde ein Stanzloch mehrmals gefüllt.
Eine photographische Aufnahme auf Photopapier, wobei der Objektträger als Negativ in den Vergrößerungsapparat eingelegt wurde, diente der Dokumentation. Alternativ wurden die Präzipitationslinien nach Schwick et al. (194) angefärbt.

2.8.5. Immunfällungen

2.8.5.1. Herstellung von Triton X-100-Extrakten

Rattenleberzellen und Mitochondrien wurden in 20 mM Na-Phosphat pH 7,2, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100

(oder in 150 mM Na-Phosphat pH 7,2, 1% Triton X-100) zu einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml gelöst. Unlösliche Reste wurden in einer Ultrazentrifuge (Beckman, Rotor 50 Ti oder 60 Ti, 40 000 rpm, 1 h) abgetrennt. Das auf der klaren Lösung schwimmende Lipid wurde entfernt.

2.8.5.2. Inkubation der Extrakte mit Antiserum bzw. IgG

Die Triton X-100-Extrakte wurden mit optimalen Mengen Serum bzw. IgG (s. 2.8.6.) versetzt, gemischt und bei 4°C mindestens 24 Stunden inkubiert. Das Immunpräzipitat wird bei 12 000 g abzentrifugiert, zunächst mit detergenshaltigem Puffer (s. 2.8.5.1.) versetzt und gewaschen, dann im gleichen Puffer ohne Detergens mehrmals gewaschen. Das Immunsediment wird schließlich in Probenpuffer für die Gelelektrophorese gelöst.

2.8.6. Titerbestimmungen

Das zur quantitativen Bildung eines Immunpräzipitats notwendige dreidimensionale Gitter aus Antigen und Antikörper wird nach Heidelberger (195, Übersicht: Ref.196) nur bei Äquivalenz von Antigen und Antikörper gebildet.
Titerbestimmungen dienen der Festlegung des für die Bildung eines Immunpräzipitats optimalen Antigen/Antikörperverhältnisses.
Zur Titerbestimmung wurde eine konstante, definierte Menge Antigen (Zell- oder Mitochondrienextrakt, Cytochromoxidase) mit unterschiedlichen Mengen Antikörper (Serum oder IgG) über Nacht inkubiert und danach abzentrifugiert. Die anschließenden Schritte sind in 2.8.5.2. beschrieben, mit der Ausnahme, daß das gewaschene Immunsediment in manchen Fällen in 50 µl 0,3 M NaOH aufgelöst wurde.
Ein Aliquot der Lösung wurde zur Proteinbestimmung verwendet.

Es wurde angenommen, daß das oben erwähnte optimale Antigen/Antikörperverhältnis dann erreicht ist, wenn das Immunsediment maximal ist. Dieses Verhältnis wurde bei der Immunfällung aus Extrakten (2.8.5.2.) eingestellt.
Die Titerbestimmung mit IgG H ist freundlicherweise von Frl. Hundt durchgeführt worden.

2.8.7. Beeinflussung der Cytochromoxidaseaktivität durch Antikörper (197,198)

Konstante Antigenmengen wurden mit unterschiedlichen Mengen IgG B-Lösung 10 Minuten bei $0^{o}C$ inkubiert. Danach wurde ein Aliquot zur Bestimmung der Cytochromoxidaseaktivität (2.9.) entnommen.

2.9. Bestimmung der Cytochromoxidaseaktivität

In dieser Arbeit wurden stets Relativbestimmungen durchgeführt. Die unten angegebenen Puffer-, Ionen- und Detergenskonzentrationen sind teilweise im Hinblick auf das Problem, Oxidaseaktivität in Gegenwart von Triton X-100, einem Inhibitor der Enzymaktivität, optimiert worden. Sie weichen von früher (7) angegebenen Bedingungen somit ab.
Die Aktivität der Cytochromoxidase wird über die Oxidation von reduziertem Cytochrom c gemessen. Man registriert im Photometer bei 546 nm die Abnahme der Extinktion des Cytochrom c.

Testansatz	400 µl	250 mM K-Phosphat pH 6,0 1% Tween-80
	25 µl	reduziertes Cytochrom c 2,5%
	75 µl	Testmaterial

Cytochrom c: Eine abgewogene Menge des Enzyms aus Pferdeherz wird in wenig Wasser gelöst und mit einigen Körnchen $NaBH_4$ bei 0^oC versetzt. Nach ca. 15 Minuten wird die Lösung auf pH 5,5 eingestellt und mit Wasser aufgefüllt, bis die Lösung 2,5% am Enzym ist.

Durchführung und Auswertung:
In einer 500 µl-Küvette werden bei 25^oC 400 µl Puffer mit 25 µl reduziertem Cytochrom c gemischt. Die durch Autoxidation bedingte Abnahme der Extinktion wird ca. 2 Min. lang mit einem Schreiber registriert. Danach wird die Testlösung so rasch wie möglich sorgfältig in die Küvette eingemischt. Die anfängliche Rate der Extinktionsabnahme nach Zusatz der Testlösung wird graphisch bestimmt und stellt, korrigiert um die Autoxidationsrate von Cytochrom c, ein direktes Maß der Cytochromoxidase dar.

2.10. Harnstoffbestimmung

Überstände perchlorsäuredenaturierter Zellen wurden mit 3 M $KHCO_3$ bis zu einem neutralen pH versetzt. Das ausfallende Kaliumperchlorat wird abzentrifugiert und der Harnstoff in den klaren Überständen nach Bergmeier et al. (270) bestimmt.

2.11. Herstellung von Zellfraktionen aus Rattenleber

Die Isolierung von Zellfraktionen erfolgte nach der Vorschrift von Hadvary (200) und Ries (199).

2.12. Isolierung der Cytochromoxidase aus Rattenleber

Die in dieser Arbeit verwendete Cytochromoxidase wurde freundlicherweise von Herrn Prof. B. Kadenbach zur Verfügung gestellt. Die Isolierung war nach (6,7)

durchgeführt worden. Das Enzym wurde in tiefgefrorenem Zustand gelagert.

2.13. Markierung mit radioaktiven Aminosäuren "in vivo"

500 µl ^{3}H-Methionin ,gemischt mit 50 µl 9% NaCl wurden ca. 140 g schweren Ratten i.p. injiziert. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Ratten betäubt und deren Leber innerhalb von 5 Minuten blutfrei gewaschen. (Medium zur Vorperfusion). Das Organ wurde dann in 20 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 aufgelöst. Nach Zentrifugation (40 000 rpm, Beckman-Ultrazentrifuge Rotor 50 Ti, 1 Stunde) wurde jeweils ein Aliquot zur Proteinbestimmung, Radioaktivitätsmessung und zur Immunfällung mit Antikörpern gegen Cytochromoxidase verwendet.

III Ergebnisse

1. Proteinsynthese in isolierten Rattenleberzellen

1.1. Experimente zur Charakterisierung des Einbaus von radioaktivem Leucin in Zellprotein

Wie in der Einleitung zuvor erwähnt, ist schon lange bekannt, daß intakte isolierte Rattenleberzellen in der Lage sind, Aminosäuren aus dem Extrazellulärraum aufzunehmen und in Protein einzubauen.
Über die Kinetik des Einbaus von radioaktiv markierten Aminosäuren sind der Literatur widersprüchliche Daten zu entnehmen: sie wird teilweise linear, teilweise aber auch als Sättigungskinetik dargestellt.
Die folgenden Experimente haben zum Ziel, den Einbau in Protein zu charakterisieren und zu optimieren.

1.1.1. Kinetik des Einbaus

Abb. 1 zeigt den zeitabhängigen Einbau von ^{3}H-Leucin in Gesamtprotein unter "optimalen" Bedingungen (siehe später). Die Kinetik weist ein Sättigungsverhalten auf und ist damit, wie erwähnt, in Übereinstimmung mit Berichten mehrerer Autoren (89,139,143,151). Wie man der Abbildung entnehmen kann, ist auch nach achtstündiger Inkubation der Sättigungswert nicht erreicht. Die damit angezeigte aktive Proteinsynthese auch nach längerer Inkubationszeit ist im Hinblick auf die geplanten Untersuchungen der Biosynthese der Cytochromoxidase (Halbwertszeit: 5-6 Tage (5,215,218)) von besonderer Bedeutung.
Für die Erklärung des Sättigungsverhaltens der Kinetik gibt es mehrere Möglichkeiten z.B.:
a) die Proteinsyntheserate nimmt kontinuierlich ab, d.h. die Zellen sterben ab,

b) die spezifische Radioaktivität der Aminosäure nimmt mit der Zeit ab (143).

Eine Klärung dieser Frage sollen spätere Experimente bringen.

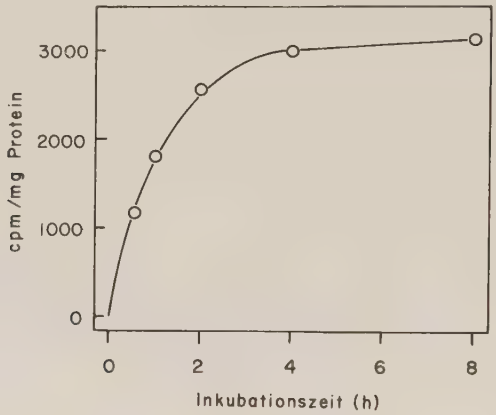


Abb. 1

Kinetik des Einbaus von ^{3}H-Leucin in Protein
1 ml Zellen (10,5 mg/ml) wurden mit 0,2 µCi ^{3}H-Leucin in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden die Proben mit 20 µl 3 M TCA-100 mM Leucin gestoppt. Im Sediment wurde der Einbau in Protein bestimmt.

1.1.2. Einbau unter verschiedenen Inkubationsbedingungen

Angesichts der in der Literatur beschriebenen unterschiedlichsten Inkubationsmedien und unter Berücksichtigung des in die katabole Richtung verschobenen Proteinmetabolismus ist die Wahl eines optimalen Inkubationsmedium wichtig.

Abb. 2 macht die Überlegenheit eines Inkubationsgemisches nach Schreiber (89) gegenüber anderen extensiv verwendeten Medien deutlich.

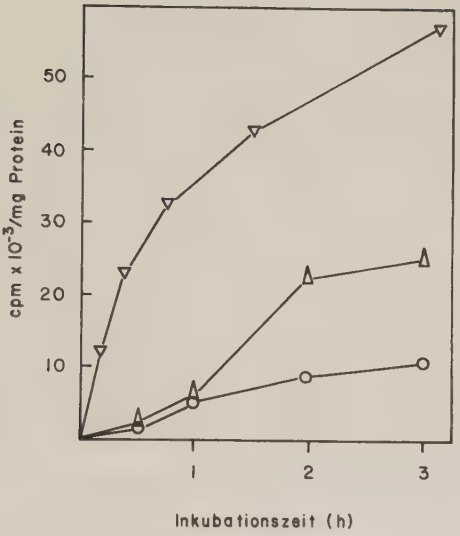


Abb. 2

Einfluß verschiedener Inkubationsmedien auf den Einbau von ^{14}C-Leucin

3 ml Zellen (7,6 mg/ml) wurden mit einem µCi ^{14}C-Leucin in verschiedenen Puffern inkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 3,2 ml. Zu verschiedenen Zeiten wurden die Proben mit 0,3 ml 3 M TCA-100 mM Leucin gestoppt und die Radioaktivität im Protein bestimmt.

Die Inkubationspuffer waren:

Krebs-Ringer Phosphat ▲

Krebs-Ringer Carbonat ○

Schreiber-Medium ▽

Von vielen Autoren (z.B.: 90,94,96,101,102,114,182) wird eine Anreicherung des Perfusions- und Inkubationsmediums mit O_2 und CO_2 durch Begasung mit Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) empfohlen. Während diese neben einem hohen Sauerstoffgehalt die Einstellung einer hohen Pufferkapazität in Medium zur Folge hat und damit eine optimale Atmung ermöglicht und eine Acidifizierung des Mediums durch katabole Endprodukte vermeidet, sind mit der Begasung auch einige Nachteile verbunden. Diese sind sowohl im apparativen Aufwand, als auch in der Behinderung bei raschen Probennahmen zu sehen.

Untersuchungen von Seglen (87) ergaben, daß hypoxe Bedingungen während der Perfusion keine negativen Folgen für die Qualität der Zellen haben und daß die Leber sogar eine dreißigminütige Anoxie tolerieren kann. Le Cam et al. (97) konnte diese Befunde unter anderem auch durch ultrastrukturelle Untersuchungen bestätigen.

Wegen der methodischen Einfachheit wurde aufgrund dieser Befunde während der Perfusion auf eine Carbogenbegasung verzichtet.

Der Einfluß von Carbogen auf die Proteinsynthese zeigt Abb. 3. Wie man der Abbildung entnehmen kann, ist eine Stimulierung des Einbaus von Leucin in Protein nicht möglich. Dieses Verhalten, das auch Schreiber et al. (82) und Berry et al. (217) beschrieben, ist dann zu erwarten, wenn die Diffusionsstrecke für Sauerstoff genügend gering ist, so daß dadurch die Zellatmung nicht limitiert wird. Man erreicht dies am einfachsten durch die Wahl eines geeigneten Verhältnisses von Oberfläche zu Schichtdicke der Zellsuspension.

Da dieses Verhältnis bei allen Experimenten in dieser Arbeit konstant gehalten wurde, konnte auf eine Begasung der Proben auch während der Inkubation verzichtet und die oben genannten Nachteile vermieden werden.

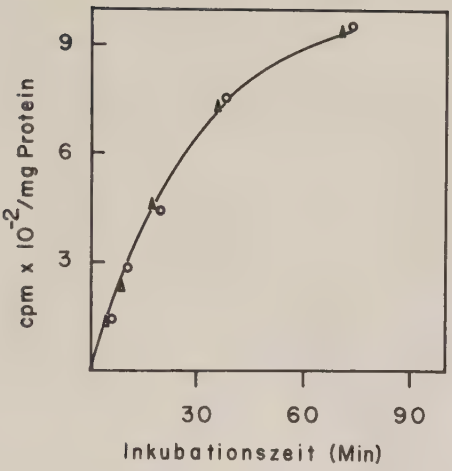


Abb. 3
Einbau von ^{14}C-Leucin in Protein unter Carbogen
2,8 ml Zellen (3 mg/ml) wurden mit 0,96 µCi ^{14}C-Leucin in einem Gesamtvolumen von 16 ml inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Aliquote zu 1,5 ml entnommen, mit 150 µl 3 M TCA-100 mM Leucin versetzt und die Radioaktivität im Protein bestimmt.
Ein Teil der Proben wurde während der Inkubation mit Carbogen begast Δ .
Kontrolle O

1.1.3. Wirkung von Hemmstoffen auf die Proteinsynthese

Zur Untersuchung der wechselseitigen Kontrolle von cytoplasmatischer und mitochondrialer Proteinsynthese sollten bei den geplanten Untersuchungen über die Biosynthese der Cytochromoxidase die Hemmstoffe Cycloheximid (CHI), Emetin und Chloramphenicol (CAP) eingesetzt werden.
Die Wirkung dieser Hemmstoffe auf die Proteinsynthese der Zellen zeigt Abb. 4.

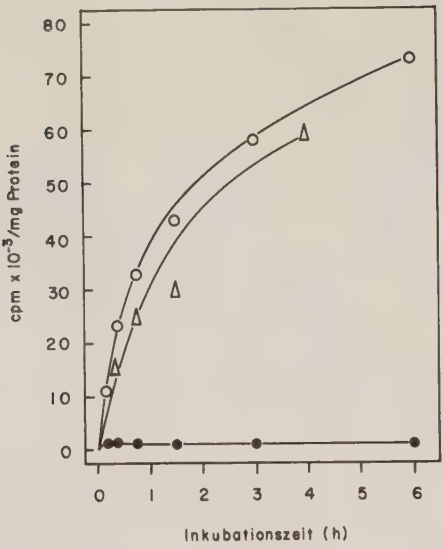


Abb. 4

Kinetik der Wirkung von Hemmstoffen auf die Proteinsynthese
3 ml Zellen (7,6 mg/ml) wurden mit 1 µCi ^{14}C-Leucin und Hemmstoffen in einem Gesamtvolumen von 3,2 ml inkubiert. Kontrolle ○ , + 38,7 µMol CAP △ , + 32 µMol CHI + 1 µMol Emetin ● .
Nach verschiedenen Zeiten wurde die Inkubation mit 0,3 ml 3 M TCA-100 mM-Leucin gestoppt. Im Sediment wurde die Radioaktivität im Protein bestimmt.

Im Vergleich zur Kontrolle bewirkt die Hemmstoffkombination CHI und Emetin eine nahezu vollständige Aufhebung des Einbaus von Leucin in Übereinstimmung mit vielen Ergebnissen in der Literatur (Übersicht: Ref.77).
Da die mitochondriale Proteinsynthese nur zu ca. 5-10% (77,219) an der Gesamtproteinsynthese beteiligt ist, kann man beim Einsatz von CAP, wie man auch den Werten in der Abbildung entnehmen kann, nur eine geringe Minderung des Einbaus erwarten.
Abb. 5 zeigt die Wirkung von CHI alleine auf die Proteinsynthese in Abhängigkeit von der Zeit.

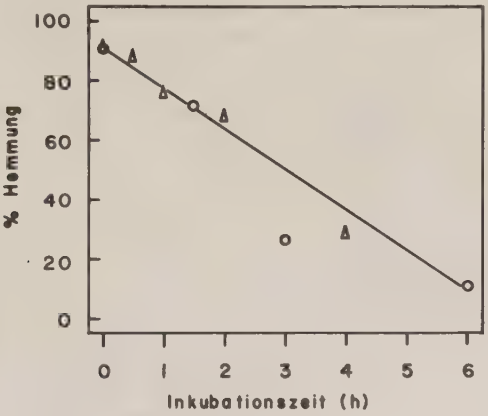


Abb. 5
Kinetik der Hemmung der Proteinsynthese durch CHI
3 ml Zellen (7,6 mg/ml Experiment A bzw. 23,7 mg/ml Experiment B) wurden mit 1 µCi ^{14}C-Leucin in einem Gesamtvolumen von 3,2 ml inkubiert. Die Endkonzentrationen CHI betrug 1 µMol/ml x mg. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeiten mit 0,3 ml 3 M TCA-100 mM Leucin gestoppt. Im Sediment wurde die Radioaktivität/mg Protein bestimmt.
Experiment A o
Experiment B Δ

Man findet eine lineare Abnahme der Hemmung von anfänglich über 90% auf unter 20% nach 6 Stunden.
Um eine vollständige Inhibierung der cytoplasmatischen Proteinsynthese über längere Inkubationszeiten aufrecht zu erhalten, wurde CHI mit einer niedrigen Dosis Emetin kombiniert.

1.1.4. Einfluß der Zellkonzentration auf den Einbau

Die Abhängigkeit des Einbaus von Leucin in Protein von der Zellkonzentration ist in Abb. 6 dargestellt.

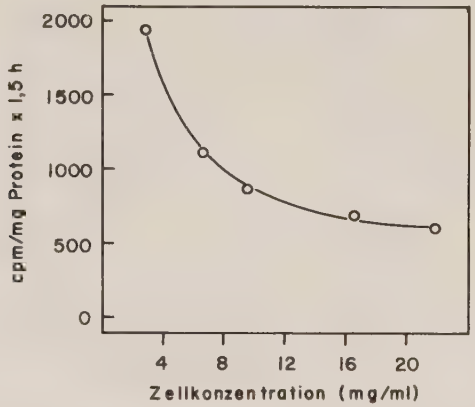


Abb. 6
Einfluß der Zellkonzentration auf die Proteinsynthese
Verschiedene Mengen Hepatocyten (9,96 mg/ml) wurden in einem Endvolumen von 8 ml mit 0,48 µCi ^{14}C-Leucin 1,5 h lang inkubiert. Der Einbau wurde nach dieser Zeit durch Zugabe von 32 ml 0,3 M TCA-10 mM Leucin bei 0°C gestoppt. Im Sediment wurde die Radioaktivität/mg Protein bestimmt.

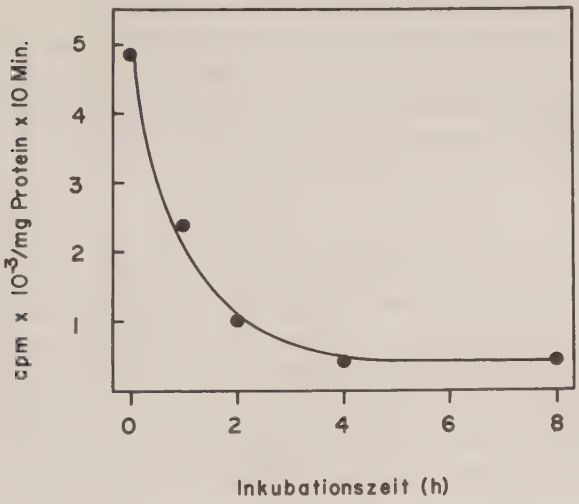
Die zu entnehmende Abnahme der Proteinmarkierung deckt sich mit Befunden von Seglen (143,151) und erklärt sich durch die Abnahme der spezifischen Radioaktivität der Aminosäure infolge der Eigenschaft der Zellen, Aminosäuren ins Medium abzugeben.

1.2. Experimente zur Bestimmung der Proteinsyntheserate

Die folgenden Experimente sollen mittels der Bestimmung der Leucinkonzentration im Precursorpool der Proteinsynthese eine Kalkulation der Proteinsyntheserate ermöglichen.

1.2.1. Rate des Leucin-Einbaus

Abb. 7 zeigt die Rate des Leucineinbaus und macht noch einmal die drastische Abnahme der Inkorporation in Protein auf ca. ein Zehntel nach schon vierstündiger Inkubation deutlich.



1.2.2. Leucin-Konzentration im Precursorpool für die Proteinsynthese

Die Berechnung der für die Proteinsynthese maßgeblichen spezifischen Radioaktivität des Leucins setzt die Kenntnis der Leucinkonzentration im Vorläuferpool voraus.
Über die Natur des (der) Precursorpools werden in der Literatur widersprüchliche Angaben gemacht. Fazit all dieser Untersuchungen ist, daß das wässrige Zellkompartiment (inulinimpermeabler Raum) mit größter Wahrscheinlichkeit nicht diesen Precursorpool repräsentiert. Ein Abzentrifugieren der Zellen, gefolgt von einer Proteindenaturierung und einer Bestimmung der Aminosäurekonzentration im Überstand, eine Methode, die zur Bestimmung intrazellulärer spezifischer Aktivitäten von Aminosäuren allgemeine Verwendung findet, wird somit dem Problem nicht gerecht.
Um die Schwierigkeiten einer zweifelsfreien Lokalisierung des Vorläuferpools zu umgehen, wurde in Anlehnung an Rubin und Goldstein (239) die Methode der Isotopenverdünnung angewandt.
Diese Methode basiert auf der Vorstellung, daß die Menge an radioaktiver Aminosäure, die in Protein eingebaut wird, davon abhängt, wie stark die radioaktive Aminosäure im Precursorpool verdünnt wird, d.h. wie groß die Konzentration an unmarkierter Aminosäure ist.

Abb. 7
Rate des ^{3}H-Leucin-Einbaus
1 ml Zellen (10,5 mg/ml) wurden mit 1 µCi ^{3}H-Leucin in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml 10 Min. lang inkubiert. Der Start des Einbaus zu den verschiedenen Zeiten erfolgte durch Zugabe der Radioaktivität. Durch Zusatz von 20 µl 3 M TCA-100 mM Leucin wurde der Einbau gestoppt. Anschließend wurde die Radioaktivität im Protein bestimmt.

Bei vorgegebener extracellulärer Aminosäurekonzentration stellt dann die Verminderung des radioaktiven Einbaus ein Maß für die Precursorpoolkonzentration dar (Gl.1).

$$\text{Gl.1} \qquad \frac{c_n}{c_o} = \frac{cpm_o - cpm_T}{cpm_T}$$

c_n = extrazelluläre Aminosäurekonzentration (mM)
c_o = (unbekannte) Aminosäurekonzentration im Precursorpool (mM)
cpm_o = Einbau in Protein bei $c_n = 0$, d.h. bei Inkubation mit einer Tracerdosis (cpm/mg)
cpm_T = Einbau in Protein bei variablen c_n (cpm/mg)

Da bei dem kleinsten c_n, das bei derartigen Untersuchungen eingestellt wurde, die unmarkierte Aminosäure in einer um den Faktor 5×10^6 höheren Konzentration vorlag, konnte die Menge markierter Aminosäure vernachlässigt werden.
Trägt man, wie in Abb. 8 gezeigt, die relative Erniedrigung der Inkorporierung gegen die extracellulär eingestellte Aminosäurekonzentration auf, so ergibt sich eine Kurve mit typischem Sättigungsverhalten.
Die Steigung im Nullpunkt repräsentiert die Aminosäurekonzentration im Precursorpool.
Zur Bestimmung der Steigung wird die Kurve durch Gl.2 angenähert:

$$\text{Gl.2} \qquad X = \frac{A\, c_n}{B + c_n}$$

$$X = \frac{cpm_o - cpm_T}{cpm_T}$$

A,B = Kurvenparameter

Zur Bestimmung von A und B wird Gl.2 umgeformt (Gl.3):

$$\text{Gl.3} \qquad \frac{X}{c_n} = \frac{A}{B + c_n}$$

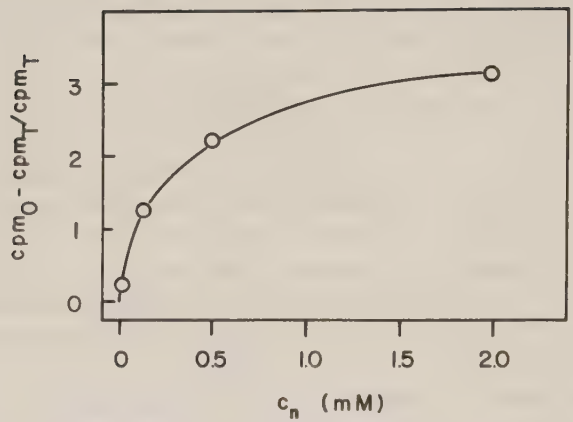


Abb. 8

Relativer Einbau von ^{3}H-Leucin in Protein in Abhängigkeit von der extracellulären Leucinkonzentration
1 ml Zellen (10,5 mg/ml) wurden mit 100 µlCi ^{3}H-Leucin (50 Ci/mMol, 1 mCi/ml) in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml inkubiert. Die extracelluläre spezifische Radioaktivität wurde durch Zusatz von unmarkierter Aminosäure variiert, wobei die jeweiligen Endkonzentrationen an ^{12}C-Leucin waren: 0,20,125,500 und 2000 µM. Der Einbau wurde durch Zusatz der Radioaktivität gestartet und nach 10 Min. durch TCA (20 µl 3 M) beendet. Im Sediment wurde anschließend die Radioaktivität im Protein bestimmt.

Wird jetzt, wie in Abb.9, c_n/X gegen c_n aufgetragen, so gibt die Steigung der resultierenden Gerade den Wert 1/A und der Ordinatenabschnitt den Wert B/A wieder.
Nun wird in Gl.2 der Parameter X (die relative Erniedrigung der Inkorporation) durch c_n/c_o (Gl.1) ersetzt (Gl.4):

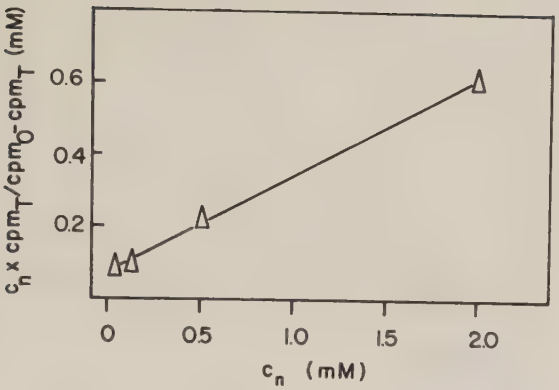


Abb. 9
Darstellung des relativen Einbaus nach Gl.3
Die Daten aus Abb. 8 sind nach Gl.3 aufgetragen.

Gl.4 $$\frac{c_n}{c_o} = \frac{A\ c_n}{B+c_n}$$

Die Steigung dieser Kurve ergibt sich durch Differentiation nach c_n (Gl.5):

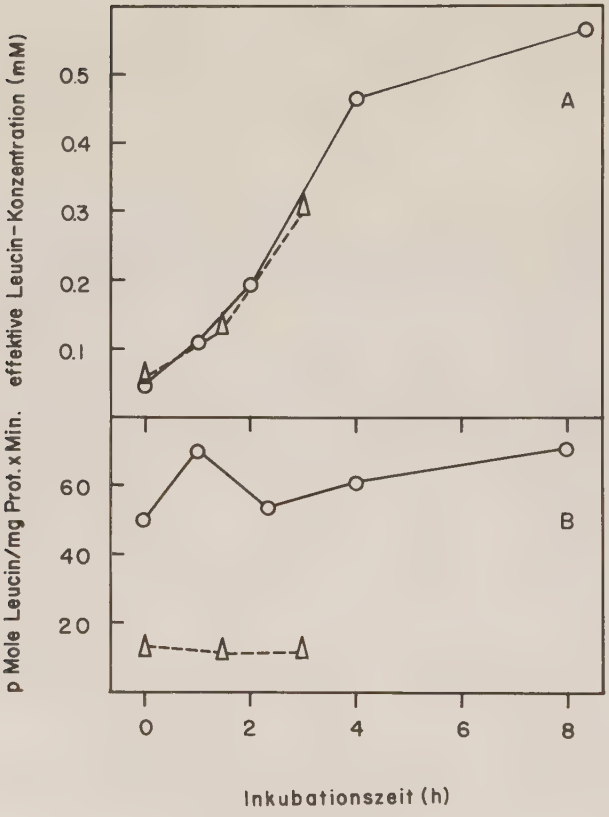
Gl.5 $$\frac{d(\frac{c_n}{c_o})}{dc_n} = \frac{A(B+c_n) - Ac_n}{(B+c_n)^2}$$

Im Nullpunkt (c_n=0) ergibt sich (Gl.6):

Gl.6 $$\frac{1}{c_o} = \frac{A}{B}$$

Einsetzen der oben erhaltenen Werte für A und B in Gl.6 liefert die gesuchten Aminosäurekonzentrationen im Precursorpool für die Proteinsynthese.

Die auf diese Weise bestimmten Leucinkonzentrationen sind in Abb. 10A in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt.



Während der ersten vier Stunden findet man einen raschen, danach einen langsameren Anstieg.
Aus mehreren Experimenten ergibt sich für frisch isolierte Zellen im Mittel eine Leucinkonzentration von 55 µM im Precursorpool. Nach einer Inkubation von 8 Stunden erhöht sich diese Konzentration auf 550 µM.
Vergleicht man die Daten aus Abb. 10A mit den Leucinkonzentrationen, die die isolierte perfundierte Leber im Plasma einstellt 223-691 uM (216,240,241), so findet man eine gute Übereinstimmung. Es liegt somit die Vermutung nahe, daß der Extrazellulärraum mit dem Precursorpool äquilibriert.

Abb. 10
Einfluß von Glukose auf die Leucinkonzentration im Precursorpool und auf die Proteinsyntheserate
1 ml Zellen (10,5 mg/ml (Experiment mit Glukose) bzw. 20 mg/ml (Experiment ohne Glukose)) wurden in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 1 µCi ^{3}H-Leucin in 100 µl zugesetzt, wobei die spezifische Radioaktivität durch Zugabe von nichtmarkierter Aminosäure variiert wurde. Es ergaben sich folgende Endkonzentrationen an ^{12}C-Leucin: 0,25,125,500 und 2000 µM. Nach einer Inkubationsdauer von je 10 Min. wurden die Proben mit 20 µl 3 M TCA-100 mM-Leucin gestoppt und die Radioaktivität im Protein bestimmt.
Die Leucinkonzentration im Precursorpool (A) wurde nach der im Text beschriebenen Methode bestimmt und diente daraufhin zur Berechnung der Proteinsyntheserate (B).
Medium mit Glukose o
Medium ohne Glukose Δ

Wie der Abb. 10A ebenfalls zu entnehmen ist, haben Glukose und unterschiedliche Zellkonzentrationen weder einen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Einstellung der Konzentrationsverhältnisse noch auf deren Wert.
Aufgrund der Untersuchungen von Seglen (143) sowie der Daten aus Abb. 6 sollte man auch keine Effekte infolge der unterschiedlichen Proteinkonzentration erwarten, wenn man eine Äquilibrierung des Precursorpools mit dem Extrazellulärraum annimmt.

1.2.3. Rate der Proteinsynthese

Auf der Basis der in 1.2.2. bestimmten Leucinkonzentrationen läßt sich unter der zuvor erwähnten Annahme einer Äquilibrierung von Precursorpool und Extrazellulärraum die Proteinsyntheserate berechnen. Sie ist in Abb. 10B dargestellt für die in Abb. 10A gezeigten Werte. In diesem Fall findet man einen ausgeprägten Effekt der Glukose, der die Empfindlichkeit der Proteinsynthese gegenüber Änderungen im Energiestatus der isolierten Zellen wiedergespiegelt.
Es zeigt sich außerdem, daß die Proteinsyntheserate selbst über eine Inkubationszeit von 8 Stunden eine konstante Größe ist. In Übereinstimmung damit findet man nach einer Inkubation von 8 Stunden mit Trypanblau nur 5-10% mehr anfärbbare Zellen als in frisch isolierter Suspension. Die Proteinsyntheserate beträgt unter optimalen Bedingungen durchschnittlich 99,2 pMole Leucin/mg Protein x Minute. Unter Berücksichtigung eines prozentualen Anteils von 8,75% des Leucins am Rattenleberprotein (242) ergibt sich die Proteinsyntheseleistung zu 2,8 mg Protein/g Feuchtgewicht x Stunde. Damit stimmt sie mit Werten von Wagle (243) (3 mg/g x h) und McGivan (164) (100 pMole Leucin/g Protein x Minute) überein und übertrifft Daten von May et al. (246), die eine Proteinsyntheseleistung von 1,65 mg/g x Stunde berichten.

Da die "in vivo"-Rate in der Literatur mit 7,5 mg/g x Stunde angegeben wird (242,244,245), repräsentiert die hier gemessene Syntheserate ca. 37% der "in vivo"-Aktivität. Nachdem die Syntheserate über 8 Stunden konstant bleibt, muß die in Abb.1 gefundene Sättigungskinetik des Einbaus ausschließlich auf die Herabsetzung der spezifischen Radioaktivität im Precursorpool der Aminosäuren zurückgeführt werden. Dies stimmt mit Experimenten von Seglen (143) überein, der einen raschen Transport von Aminosäuren aus den Zellen in den Extrazellulärraum fand, ein Befund, der durch das isolierte perfundierte Organ bestätigt wird (216).

1.3. Untersuchungen über den Einfluß von Hemmstoffen der Proteindegradation auf den Proteinmetabolismus

Seglen (146,151) konnte in isolierten Rattenleberzellen eine gegenüber dem Organ verstärkte negative Stickstoffbilanz messen. Er folgerte daraus, daß sich die Zellen in einem proteinkatabolen Zustand befinden. Dieser Schluß wird durch Experimente von Hopgood et al. (174) bestätigt. Die erhöhte Proteindegradation läßt sich durch verschiedene Agentien zum Teil wieder aufheben.
Die Frage, die in den folgenden Experimenten untersucht werden soll, ist, ob diese Effektoren auch eine Wirkung auf die Proteinsynthese haben, d.h. ob sich die Proteinsynthese erhöhen läßt.

1.3.1. Harnstoffsynthese

Abb.11 zeigt die Harnstoffsynthese isolierter Leberzellen über 4 Stunden. Bei einem linearen Anstieg findet man eine Syntheserate von 19,2 pMol/g Protein x Stunde in Übereinstimmung mit Daten von Meijer et al. (148). Andere Autoren (146,123) finden höhere, voneinander verschiedene Werte, die aber zum Teil auf eine Aktivierung der Harnstoffsynthese durch das im Medium enthaltene Ornithin (148,247),

zum Teil auf unterschiedliche Substrate (123) zurückzuführen ist.
Aus Abb.11 läßt sich weiterhin erkennen, daß eine Extrapolation der Kinetik auf Null unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen für den endogenen Harnstoffspiegel in den Zellen einen übereinstimmenden Wert ergibt. Aus mehreren Präparationen ließ sich ein Wert von 21,1 ± 1,1 µMole Harnstoff/g Protein (n=9) ermitteln.

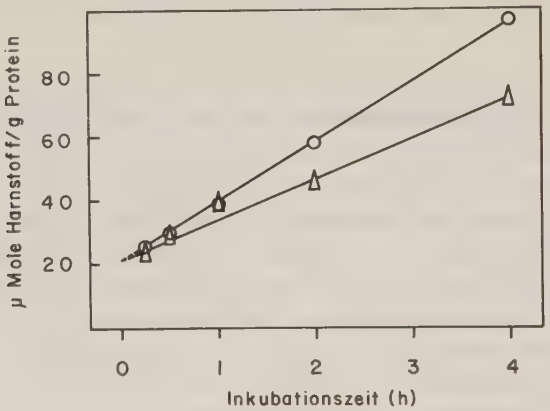


Abb. 11
Kinetik der Harnstoffbildung
1 ml Zellen (15 mg/ml) wurden in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml inkubiert. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeiten durch Zusatz von 50 µl $HClO_4$ gestoppt. Nach Abzentrifugieren des Präzipitats wurde im Überstand Harnstoff bestimmt.
Ein Teil der Proben wurde mit PMSF (0,5 mM) inkubiert Δ .
Kontrolle o

1.2.3. Wirkung von Ammoniumchlorid auf die Proteinsynthese

Eine Reduktion der Proteindegradation durch hohe Konzentrationen von Ammoniumchlorid auf die Hälfte ist in der Literatur beschrieben (s.o.). Die Wirkung auf die Proteinsynthese ist Abb. 12 zu entnehmen.

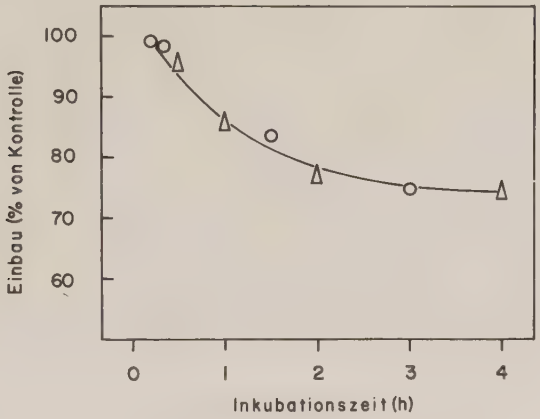


Abb. 12

Kinetik der Wirkung von NH_4Cl auf den Einbau von ^3H- Leucin in Protein

1 ml Zellen (20 mg/ml) wurden mit 10 µCi ^3H-Leucin in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml inkubiert. Die Proben wurden zu verschiedenen Zeiten mit 50 µl $HClO_4$ gestoppt. Die Radioaktivität im Protein wurde im Sediment bestimmt. Endkonzentrationen an NH_4Cl:

13 mM ▲ , 5 mM ○ .

Wie aus den Experimenten von Seglen (151) hervorgeht, ist bei Inkubation von Zellen in einem Medium, das ein Aminosäuregemisch enthält, keine Konzentrationsabhängigkeit der Proteinmarkierung von der Ammoniumchloridkonzentration zu erwarten. Dies wird durch die Daten in Abb. 12 bestätigt.

Des weiteren muß man eine zunehmende Hemmung des Einbaus von Leucin in Protein bei längeren Inkubationszeiten feststellen. Nach ungefähr 4 Stunden scheint ein Endwert der Hemmung erreicht zu sein, der bei ca. 25% liegt.

In einer früheren Arbeit fand Seglen (151) keine Hemmung der Proteinmarkierung während einer einstündigen Inkubation. Das konnte in einer neueren Arbeit (147) nicht mehr bestätigt werden. Die dort gezeigten Daten lassen eine Hemmung durch das Salz von ca. 20% nach einer Inkubation von 60-80 Minuten erkennen. Wegen der starken Streuung dieser Daten ist ein direkter Vergleich mit den hier gemessenen Werten nicht möglich.
Auf den Zusatz von Ammoniumchlorid zum Inkubationsmedium wurde wegen der deutlichen Hemmung der Inkorporation verzichtet.

1.3.3. Wirkung von EDTA, PMSF, EGTA und Insulin auf den Einbau von Leucin

Hopgood et al. (174) konnten eine hemmende Wirkung von EDTA, PMSF, EGTA und Insulin auf die Proteindegradation in isolierten Hepatocyten messen.
Der Einfluß auf die Proteinsynthese ist in Abb. 13A gezeigt.

Auffallend ist die starke Streuung der Meßpunkte, die möglicherweise auf statistische Schwankungen bei der Radioaktivitätsbestimmung zurückzuführen ist. Trotzdem läßt sich erkennen, daß die Werte im allgemeinen innerhalb einer Abweichung von nur 5% nach jeder Seite von den Kontrollwerten liegen.

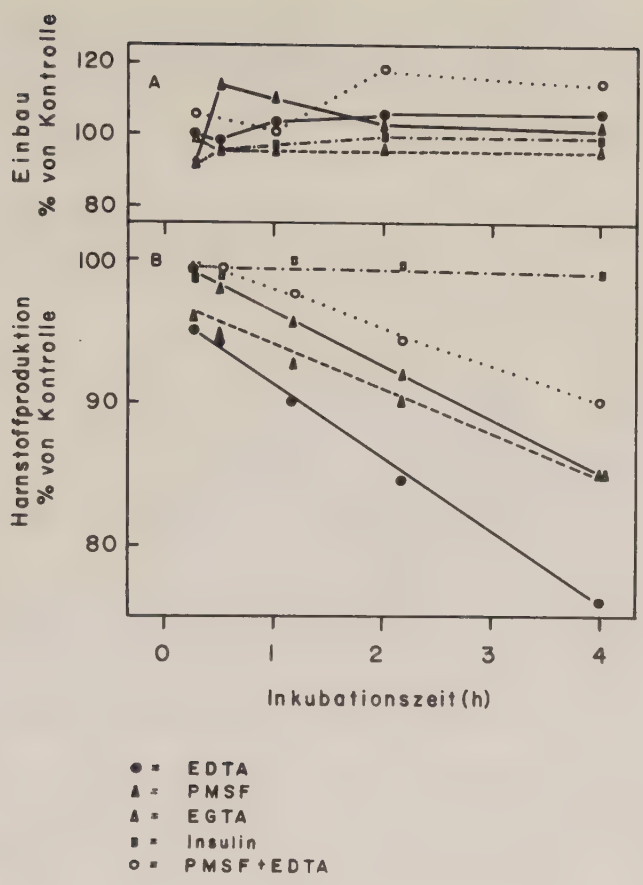


Abb. 13

Wirkung von Inhibitoren der Proteindegradation auf den Einbau von ^{3}H-Leucin in Protein und auf die Harnstoffproduktion

1 ml Zellen (15 mg/ml) wurden mit 0,1 ml ^{3}H-Leucin in einem Gesamtvolumen von 1,2 ml inkubiert, das in 0,1 ml folgende Zusätze enthielt: EDTA (1 mM) oder PMSF (0,5 mM) oder EDTA und PMSF (1 mM + 0,5 mM) oder EGTA (1 mM) oder Insulin (70mM) oder Medium (Kontrolle).

Nach verschiedenen Zeiten wurde die Inkubation durch Zusatz von 50 µl $HClO_4$ gestoppt. Nach Abzentrifugation des Präzipitats wurde im Überstand Harnstoff, im Sediment Radioaktivität/mg Protein bestimmt.

EDTA, EGTA und auch Insulin zeigen keine Wirkung, während das Verhalten von PMSF und der Kombination PMSF und EDTA nicht deutlich genug ist, um daraus eine Wirkung auf die Proteinsynthese erkennen zu können.
Aus den Experimenten von Wagle et al. (248,249), die eine deutliche Stimulierung der Proteinsynthese um ca. 100% durch Insulin zeigen, sowie auch aus Arbeiten anderer Autoren, die eine Stimulierung der Markierung spezieller Proteine berichten (250,111), sollte man eine ähnliche Wirkung des Hormons auch auf die in dieser Arbeit verwendeten Hepatocyten erwarten.
Auch auf die Harnstoffproduktion hat Insulin keinen Einfluß (Abb. 13B). Bojar (101) konnte eine Abnahme der Harnstoffsynthese um ca. 30% innerhalb einer Stunde messen.

PMSF, EDTA und EGTA zeigen eine Inhibierung der Harnstoffproduktion zwischen 10 und 25% nach vierstündiger Inkubation.
Die ausgeprägte Wirkung von EDTA ist nach Hopgood et al. (174) in einer Stabilisierung der zellulären Integrität zu sehen. EDTA wirkt offenbar nicht über eine Komplexierung von Ca-Ionen, wie die schwächere Wirksamkeit von EGTA, einem Chelatbildner mit hoher Affinität zu Calcium beweist.
Für PMSF, einem Hemmstoff der Serin-Proteasen wird eine Hemmung der Proteindegradation von ca. 19% berichtet (147), in Übereinstimmung mit der Geraden in Abb. 13B.
Die Kombination PMSF und EDTA ist weniger wirksam als jede der einzelnen Komponenten, was auf eine antagonistische Wirkung dieser Stoffe auf die Harnstoffsynthese hinweist.

Der Vergleich von Abb. 13B mit Abb. 13A macht deutlich, daß die verwendeten Substanzen zwar wie in der Literatur beschrieben, die Proteindegradation hemmen (Ausnahme Insulin), jedoch nicht in der Lage sind, die Proteinsynthese zu stimulieren.

2. Immunologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen Cytochromoxidase

2.1. Ouchterlony-Tests

Die Doppeldiffusionsmethode von Ouchterlony (192) ist eine immunologische Methode zur Charakterisierung von Antigenen und Antikörpern. Bei Verwendung balancierter Systeme (Antigen und Antikörper in optimalem molaren Verhältnis) (201-203) lassen sich neben der minimalen Zahl von Antigen/Antikörperpaaren (201,202) die Größenordnung des Molekulargewichts der reagierenden Spezies (202,205,206) sowie durch Vergleich mit bekannten Antigen/Antikörperpaaren immunologische Verwandtschaften bestimmen.
Die Nachteile dieses Tests liegen zum Teil darin, daß die Theorie nicht direkt auf multispezifische Antigen/Antiköperpaare übertragen werden kann (201), zum Teil darin, daß exakte Schlußfolgerungen nur bei Verwendung balancierter Systeme (s.o.) und monospezifischer Antikörper gezogen werden können (203) und schließlich darin, daß neben der Begrenzung der Untersuchungen auf Antigene mit MW unter 200000 (202,201) Lipide und Detergentien (202) Artefakte liefern können.

2.1.1. Serum B, IgG B

2.1.1.1. Serum B

Bild 1
Zahl und Lage der Banden:
Bei der Reaktion isolierter Cytochromoxidase in Position 5 mit dem Antiserum (Zentralloch) sind drei Präzipitationslinien erkennbar. Die dem Antigen zugewandte Linie (Nr.1) ist am stärksten und am schärfsten entwickelt. In geringem Abstand zum Antikörperloch hin folgt eine zweite scharfe,

jedoch weit schwächere Bande (Nr.2). Eine dritte, relativ breite Präzipitationslinie (Nr.3) ist nahe am Antikörperloch gelegen.
Da die Zahl der sichtbaren Präzipitationslinien im Ouchterlony-Test die minimale Zahl der vorhandenen Antigen/Antikörperpaare darstellt (201,202), sollte gefolgert werden, isolierte Cytochromoxidase bestehe aus einem Gemisch dreier verschiedener Antigene, die durch entsprechende Antikörper erkannt werden.

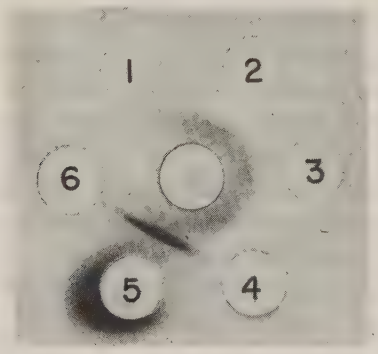


Bild 1
Ouchterlony-Test von Serum B
Zentrum : Serum B
Position 1 : Cytochromoxidase mit SDS/Mercaptoäthanol gespalten 0,32 mg/ml
Position 2 : Cytochromoxidase in 1% Triton X-100 0,66% SDS 6,35 mg/ml
Position 3 : Cytochromoxidase in 1% Cholat 0,66% SDS 6,35 mg/ml
Position 4 : Cytochromoxidase in 1% Tween-80 0,66 SDS 6,35 mg/ml
Position 5 : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 1,9 mg/ml
Position 6 : Cytochromoxidase SDS-gespalten 0,32 mg/ml

Während die beiden Präzipitationslinien Nr. 1 und Nr. 2 aufgrund ihrer Lage in der Mitte zwischen Antigen- und Antikörperloch und ihrer Stärke und Schärfe sicherlich das Produkt der Reaktion von balancierten Systemen darstellt, gilt dies nicht unbedingt für die dritte Präzipitationslinie.
So bedeutet die nahe Lage am Antikörperloch, daß bei der Bildung der Bande 3 stark unausgewogene Konzentrationsverhältnisse vorgelegen haben (201-206). Die Realität dieses Antigen/Antikörperpaares sollte somit in einem balancierten System sowie mindestens durch eine Verdünnungsreihe nachgewiesen werden.
Für das Auftreten der Bande 2 gibt es mehrere Erklärungen:
a) es handelt sich tatsächlich um ein eigenständiges Antigen/Antikörperpaar,
b) Bande 2 ist ein Artefakt (z.B. verursacht durch Lipide (202)),
c) das Auftreten resultiert aus einer Verdopplung der Bande 1.
Während sich die zweite Möglichkeit wohl ausschließen läßt, da die isolierte Cytochromoxidase zwar noch Lipide enthält, diese aber so stark an das Enzym gebunden sind, daß sie auch mit anderen Detergentien nicht entfernt werden können (5,12-14,17) und sich die Bande im Fall von Serumlipiden auch in andere Positionen manifestieren müßte.
Für die dritte Möglichkeit gilt, daß dann eine Verdopplung einer Präzipitationsbande zu erwarten ist (201), wenn ein multispezifisches, komplexes Antigensystem (d.h. zwei Antigene mit vielen gemeinsamen Determinanten) oder ein unausgeglichenes System vorliegt. Wie die Lage der Bande beweist, liegen keine unbalancierten Konzentrationsverhältnisse vor.

Aufgrund der sichtbaren Präzipitationsmuster kann immunologisch nicht zwischen den Möglichkeiten a) und c) unterschieden werden.
Eindeutige Aussagen lassen sich durch quantitative gekreuzte Immunelektrophorese (207) oder durch kreuzweise

spezifische Absorption von Antigenen und Antikörpern erhalten.
Form der Banden:
Aus der Geradlinigkeit der Banden 1 und 2 ergibt sich, daß das Molekulargewicht des Antigens mit dem des Antikörpers vergleichbar sein muß (202) und in der Größenordnung von 150 kD liegt.
Unter Berücksichtigung eines Lipidanteils von 20% (5,17) ergibt sich das Molekulargewicht der Cytochromoxidase aus Rattenleber (bei Verwendung eines Proteinmolekulargewichts von 128 000 (7)) zu 154 kD. Da die native Form der Oxidase das enzymatisch aktive Dimere ist (5,17), wofür sich ein Molekulargewicht von ca. 300 kD ergäbe, läßt die Form der genannten Banden vermuten, daß das enzymatisch inaktive Monomere des Enzyms mit dem Antikörper reagiert haben muß. Diese Vermutung wird durch die Eigenschaften des Gels gestützt, die eine Diffusion von Proteinen mit Molekulargewichten oberhalb 200 kD (s.o.) nicht gestattet.
Da man davon ausgehen kann, daß das Immunogen, die isolierte aktive Cytochromoxidase in Tween-80-haltigem Puffer, dimer oder sogar tetramer (5,17 und dort zitierte Literatur) während der Immunisierung vorgelegen hat, folgt, daß das im Ouchterlony-Test reagierende Antigen mit dem Immunogen nicht identisch ist.
Die Möglichkeit, daß bei der offensichtlich erfolgten Dissoziation der Dimere nicht identische Monomere entstanden, ist nicht auszuschließen. So zeigen die SDS-PAGE-Muster immunpräzipitierter Cytochromoxidase 2 verschiedene Subunits I und 3 verschiedene Subunits VII. Die Reaktion von immunologisch nicht identischen Monomeren mit dem Antikörper könnte das Auftreten der Präzipitationslinien 1 und 2 erklären und stände mit der o.g. Interpretationsmöglichkeit c) im Einklang.

Interferenz mit Nachbarantigenen:
Die Präzipitationslinie 1 in Position 5 fusioniert mit einer schwächeren Bande in Position 4, was die immunologische Identität dieser Banden beweist. Die identischen Antigene sind auch in Position 3 und 2 zu erkennen.
Bande 3 in Position 5 geht in Position 4 in eine stark verbreiterte, diffuse Bande über, an deren Ränder etwas verstärkte Präzipitationslinien zu erkennen sind (4a und 4b). Auch hier bedeutet das Ineinanderlaufen der Präzipitationslinien Identität der Antigene, die somit auch in Position 2 und 3 gesichert ist.
Das Präzipitationsmuster der Antigene in den Positionen 2, 3 und 4 ist völlig identisch, was bedeutet, daß unterschiedliche Detergentien auf die Antigendeterminanten keinen Einfluß gehabt haben. Der gemeinsame Unterschied gegenüber dem Antigen in Position 5 ist, daß dieses kein SDS enthielt. Offensichtlich hat SDS eine teilweise Auflösung des Antigens bewirkt, das für die Präzipitationslinie 1 verantwortlich ist. Die Teilstücke erscheinen wahrscheinlich in der Präzipitationslinie 3. Ein geringeres Molekulargewicht der Antigene in dieser Bande wird durch deren abgerundetes Aussehen bestätigt.
Wenn man berücksichtigt, daß in den Positionen 2, 3 und 4, verglichen mit der Position 5 die dreifache Menge Antigen aufgetragen wurde, so scheint das Fehlen der Bande 2 in den ersten drei Positionen ebenso wie die Schwächung der Bande 1 auf die Wirkung des SDS zurückzuführen zu sein.

Die Antigene in den Positionen 1 und 6 bildeten keine sichtbaren Präzipitationslinien, was sicher auf die geringe Konzentration zurückzuführen ist. Allerdings deutet die Ablenkung der Bande 3 in den Positionen 2 und 5 in Richtung der Positionen 1 und 6 auf die Anwesenheit immunologisch identischen Materials in den letztgenannten Positionen hin. Dies würde bedeuten, daß selbst bei intensiver SDS-Behandlung antigene Determinanten bewahrt worden sind.

Bild 2

Ouchterlony-Test von Serum B

Zentrum : Serum B

Position 1 : Cytosol in 1% Triton X-100 (2,94 mg/ml)

Position 2 : Homogenat in 1% Triton X-100 (4,73 mg/ml)

Position 3 : Mitochondrienmembran in 1% Triton X-100 (11,76 mg/ml)

Position 4 : Mitochondrienmatrix in 1% Triton X-100 (5,04 mg/ml)

Position 5 : Mikrosomen in 1% Triton X-100 (15,75 mg/ml)

Position 6 : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (1,9 mg/ml)

Das Antigen in Position 6 (Bild 2) ist mit demjenigen in Position 5 in Bild 1 identisch, es gilt das dort Gesagte.

Eine Präzipitationslinie mit den Fraktionen als Antigenquelle wäre in den Positionen 2 (Homogenat) und 3 (Mitochondrienmembran) zu erwarten. Während dies auch bei der Mitochondrienmembran der Fall ist, fehlt bei allen übrigen Fraktionen eine Reaktion. Entweder sind bei diesen Fraktionen die Antigenkonzentrationen für eine Präzipitation zu niedrig gewesen oder es waren keine antigenen Determinanten vorhanden (mehr Fraktionmaterial läßt sich nicht in die Antigenlöcher auftragen). Welche Möglichkeit die

zutreffende ist, kann nur durch andere Methoden entschieden werden. Die Lage der Präzipitationslinie bei der Mitochondrienmembran als Antigenquelle legt deren Identität mit Bande 1 in Position 6 nahe.

2.1.1.2. IgG B

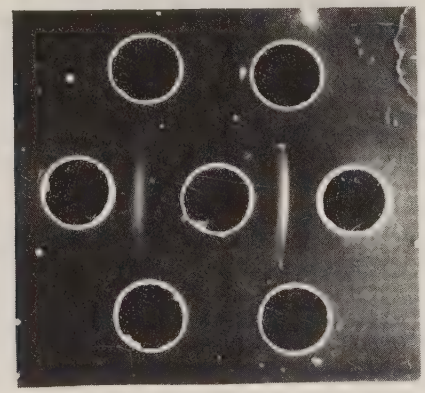


Bild 3

Ouchterlony-Test von IgG B

Zentrum : IgG B (11,25 mg/ml) in Triton X-100

Position 1 : Mitochondrienmatrix in 1% Triton X-100 (5,04 mg/ml

Position 2 : Mikrosomen in 1% Triton X-100 (15,75 mg/ml)

Position 3 : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (1,9 mg/ml)

Position 4 : Mitochondrienmembran in 1% Triton X-100 (11,8 mg/m

Position 5 : Mitochondrien in 1% Triton X-100 (14,6 mg/ml)

Position 6 : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (1,9 mg/ml)

Die Reaktion der Cytochromoxidase mit isolierten Antikörpern (Bild 3) in Position 3 zeigt zwei dicht nebeneinanderliegende Präzipitationslinien. Die Interpretation

für diese beiden, fast gleich starken Linien ist schon in 2.1.1.1. für Bild 1 gegeben worden.
Das Fehlen einer dritten Bande (Vergleich zum Serum) beweist nicht, daß das entsprechende Antigen/Antikörperpaar jetzt nicht mehr vorhanden ist, oder dessen früheres Erscheinen ein Artefakt war. Diese Möglichkeit läßt sich nur durch eine Überprüfung mittels einer Konzentrationsreihe ausschließen.
Mitochondrienmembranen und Mitochondrienextrakte (Position 4 und 5) zeigen ebenfalls Präzipitationslinien (schwach), die an den Enden ineinanderübergehen und somit identisch sind. Das Fusionieren mit den beiden Linien in Position 3 stellt auch dafür die Identität sicher. Mit der Mitochondrienmatrix und der Mikrosomenfraktion läßt sich keine Reaktion feststellen.
Deutlicher noch als in Bild 3 erscheinen in Bild 4 die beiden Präzipitationslinien als Folge der Reaktion der Oxidase (Position 3) mit isolierten Antikörpern. Leberextrakte verschiedener Konzentrationen zeigen identische Linien (Positionen 2,4 und 5), während die Cytosolfraktion (Position 1) keine Reaktion zeigt. Dies könnte aber auf einer zu niedrigen Antigenkonzentration beruhen und müßte erst anderweitig überprüft werden.

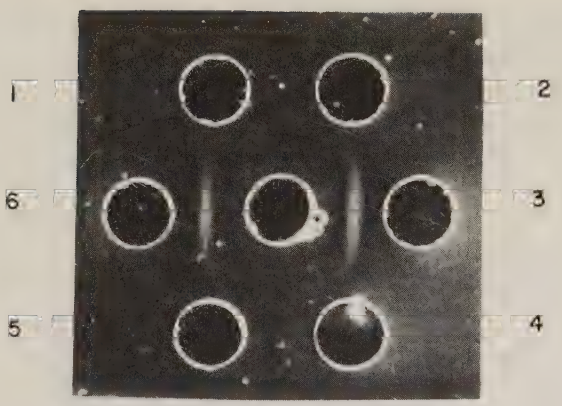


Bild 4
Ouchterlony-Test von IgG B
Zentrum : IgG B (11,25 mg/ml) in 1% Triton X-100
Position 1 : Cytosolfraktion in 1% Triton X-100 (2,94 mg/ml)
Position 2 : Homogenat in 1% Triton X-100 (4,73 mg/ml)
Position 3 : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (1,9 mg/ml)
Position 4 : Homogenat in 1% Triton X-100 (10,0 mg/ml)
Position 5 : Homogenat in 1% Triton X-100 (2,0 mg/ml)
Position 6 : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (1,9 mg/ml)

2.1.2. Serum A

Bild 5 zeigt in den Positionen 4 und 5 die Reaktion von Serum A aus zwei verschiedenen Kaninchen ca. 8 Wochen nach der Immunisierung mit isolierter Cytochromoxidase. In Position 5 erkennt man eine stärkere, in Position 4 zwei schwache, wenig scharfe Präzipitationslinien, deren Identität wegen der schwachen Ausprägung nicht überprüft werden kann.

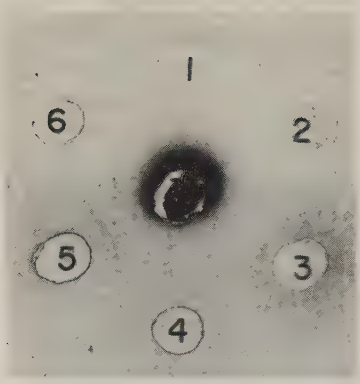


Bild 5
Ouchterlony-Test von Antiserum A
Zentrum : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (1,9 mg/ml)
Position 4 : Antiserum A, Kaninchen 1
Position 5 : Antiserum A, Kaninchen 2

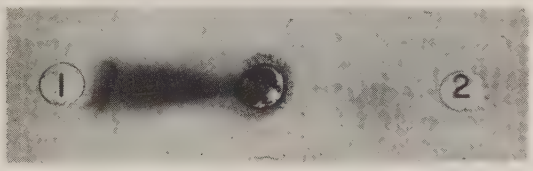


Bild 6
Überwanderungselektrophorese von Cytochromoxidase mit Antiserum A
Zentrum : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (1,9 mg/ml)
Position 1 : Antiserum A, Kaninchen 1

Für die beiden Linien in Position 4 gilt die in 2.1.1. (für Bild 1, Position 5) gegebene Interpretation, wonach die beiden Präzipitationslinien das Vorhandensein von mindestens zwei Antigenen dokumentieren. Dies wird auch durch die

Überwanderungselektrophorese (Bild 6) bestätigt. Hier läßt das diffuse Erscheinungsbild der Präzipitationslinien keine weiteren Aussagen zu.

Bild 7

Ouchterlony-Test von Antiserum A 9 Monate nach der Immunisierung

Zentrum : Antiserum A, Kaninchen 1, vierfach konzentriert
Position 1 : Anti-Kaninchen IgG-IgG (Ziege) 1,125 mg/0,1 ml
Position 2 : Cytochromoxidase in 1% Triton X-100 0,66% SDS (6,35 mg/ml)
Position 3 : Cytochromoxidase in 1% Cholat 0,66% SDS (6,35 mg/ml)
Position 4 : Cytochromoxidase in 1% Tween-80 0,66% SDS (6,35 mg/ml)
Position 5 : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (1,9 mg/ml)
Position 6 : Cytochromoxidase in 0,1% Tween-80 (3,6 mg/ml)

9 Monate nach der Immunisierung ist das Antiserum A immer noch in der Lage, Cytochromoxidase aus zwei verschiedenen Präparationen (Position 5 und 6) zu erkennen und zu präzipitieren. Die nahe am Zentrum gelegenen schwachen Banden gehen ineinander über, wodurch die Identität der

antigenen Determinanten aus beiden verschiedenen Cytochromoxidasepräparationen gezeigt wird. Cytochromoxidase in verschiedenen SDS-haltigen Detergentien bildet mit Antiserum A keine sichtbaren Präzipitate (vgl. Bild 2). Unter Berücksichtigung der vierfachen Ankonzentrierung, der nur schwachen Reaktion mit Anti-Kaninchen IgG-IgG aus der Ziege und durch den Vergleich mit Bild 8, wo Antiserum A durch IgG B ersetzt ist, wird deutlich, daß der Antikörpertiter von Antiserum A sehr niedrig gewesen ist.

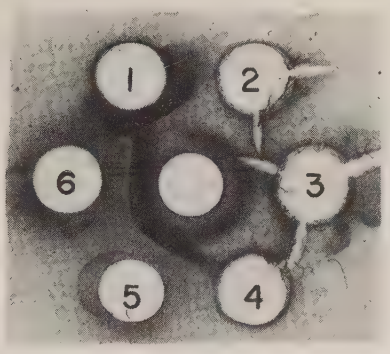


Bild 8
Ouchterlony-Test von IgG B
Zentrum : IgG B (45,0 mg/ml) in 1% Triton X-100
Die Antigene in den einzelnen Positionen sind mit denen in Bild 7 identisch.

2.2. Hemmung der Cytochromoxidaseaktivität durch Antikörper (IgG B)

Abb. 14 zeigt die Hemmung der Oxidase aus Rattenleber. Die vollständige Abnahme der Aktivität deutet darauf hin, daß der Antikörper eine Antigendeterminante blockiert, die für die Aktivität des Enzyms essentiell ist.

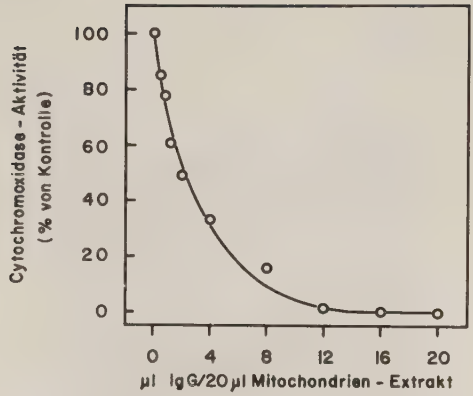


Abb. 14

Hemmung der Enzymaktivität durch isolierte Antikörper gegen Cytochromoxidase

20 µl Mitochondrien-Extrakt (2 mg/ml) wurden mit unterschiedlichen Mengen IgG B (30 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 40 µl 10Min. bei 0^{o}C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde in einem Aliquot die Cytochromoxidaseaktivität getestet.

Die Hemmung der Aktivität stellt, neben den Aussagen der Ouchterlony-Tests einen weiteren Beweis für die Spezifität der Antikörper dar.

Die minimale Menge IgG B, die nötig ist, um die Aktivität des Enzyms vollständig zu hemmen, ist geringer als die Menge Antikörper, die ein maximales Immunsediment ergibt (Abb.19). Somit stellt die Hemmung der Oxidaseaktivität eine empfindlichere und raschere Methode zur Titerbestimmung dar.

Im Gegensatz zu den Befunden von Poyton et al. (208) mit S. cerevisiae läßt sich die Enzymhemmung bei Verwendung von Antiseren nicht hemmen, da sich im verwendeten

Testsystem eine starke Trübung ergab.

2.3. SDS-Gelelektrophorese von Immunpräzipitaten mit Antikörpern gegen Cytochromoxidase

Die Aussagen, die sich aus den Ouchterlony-Tests ergeben, können die Möglichkeit nicht ausschließen, daß bei der Reaktion der Cytochromoxidase mit den entsprechenden Antikörpern mehrere völlig verschiedene Antigen/Antikörperpaare auftreten.
Die SDS-Gelelektrophorese sollte Aufschluß über die Zusammensetzung der Immunpräzipitate geben können.

2.3.1. Immunpräzipitation mit Serum A

Abb. 15 zeigt das Bandenmuster (Weber-Osborn-System) eines Immunpräzipitats, gebildet bei der Reaktion von Leberzellextrakt mit Antiserum A. Die Molekulargewichte der deutlich erkennbaren sieben Banden des Enzyms stimmen weitgehend mit publizierten Daten überein (7,210) und betragen:

I	a	36 000
	b	33 000
II		24 500
III		20 500
IV		17 500
V		12 400
VI		10 300
VII		8 500

Die Aufspaltung der Bande I läßt sich auch in anderen Gelsystemen (Harnstoff s.u., Tris-Glycin (211)) zeigen. Wie zu erwarten, treten die Antikörperuntereinheiten (MW ca. 50 000 und ca. 25 000) als deutlichste Banden hervor.

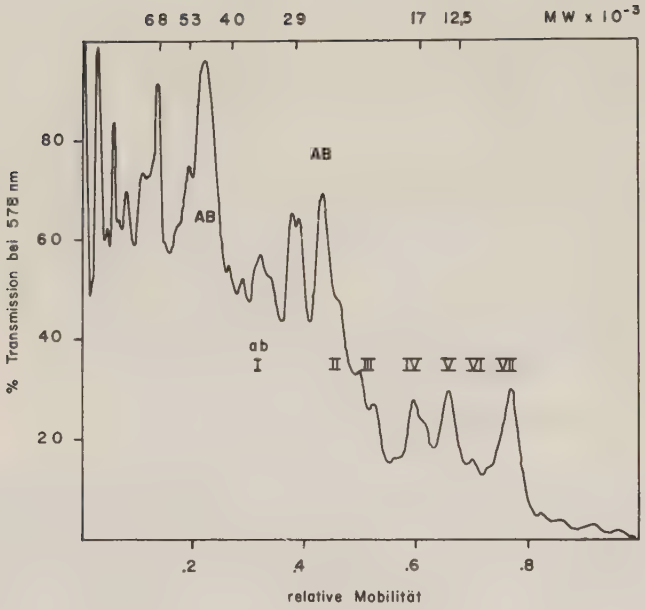


Abb. 15
SDS-Gel (Weber-Osborn) eines Immunpräzipitats aus einem Zellextrakt mit Antiserum A
Zellen wurden in 100 mM Na-Phosphat 1% Triton X-100 pH 7,2 aufgelöst. 3 ml des Extrakts (= 6 mg Protein) wurden mit dem gleichen Volumen Antiserum A inkubiert. Die gewaschenen Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE (Weber-Osborn) aufgetrennt und auf Protein angefärbt.

Auffallend sind die Peaks oberhalb MW 68 000 sowie der Doppelpeak bei MW ca. 30 000.
Bei diesem Doppelpeak könnte es sich um das Produkt eines spezifischen Antigen/Antikörperpaares handeln,

es könnte sich aber auch um eine unspezifische Mitfällung von Protein handeln.
Die Möglichkeit, daß die hochmolekularen Banden spezifische Präzipitationen von Antikörpern gegen Cytochromoxidase darstellen, ist nicht auszuschließen, da das Enzym in gereinigtem Zustand (Bild 9, Ref. 7,210) kontaminierende hochmolekulare Proteine enthält, die im Kaninchen bei der Immunisierung die entsprechenden Antikörper induziert haben könnte. Die hochmolekularen Proteine können aber auch Aggregate von Cytochromoxidaseuntereinheiten in SDS darstellen.

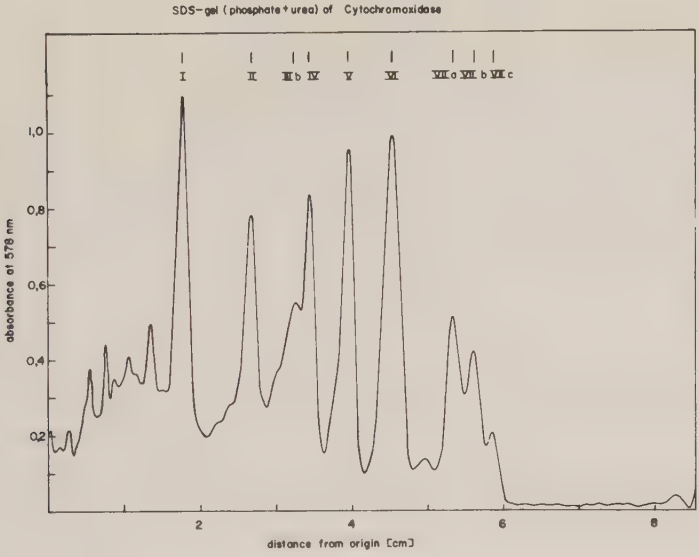


Bild 9
SDS/Harnstoff-Gel isolierter, als Immunogen eingesetzter Cytochromoxidase.
Der Ref. 210 mit freundlicher Genehmigung der Autoren entnommen.

2.3.2. Immunpräzipitation mit IgG B

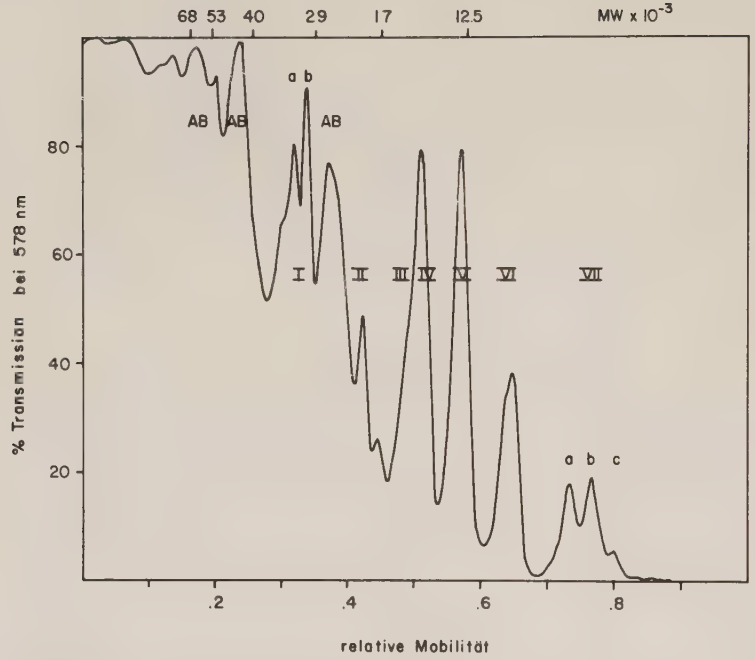


Abb. 16

SDS-Gel (Swank-Munkres) eines Immunpräzipitats aus einem Zellextrakt mit IgG B

Zellen wurden mit 20 mM Na-Phosphat 150 mM NaCl 1% Triton X-100 pH 7,2 extrahiert. 3,6 ml des Extrakts (= 7,2 mg Protein) wurden mit 0,7 ml IgG B-Lösung (75 mg/ml) inkubiert. Die gewaschenen Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE nach Swank-Munkres aufgetrennt und auf Protein angefärbt.

Abweichend von den in 2.3.1. erhaltenen Daten ergeben sich aus dem in Abb. 16 gezeigten Gel (Swank-Munkres) für die Untereinheiten der Cytochromoxidase folgende Molekulargewichte:

I	a	37 700	(± 500)	
	b	35 900	(± 300)	
II		22 600	(± 200)	
III		16 000	(± 300)	
IV		15 100	(± 500)	
V		11 500	(± 400)	
VI		8 300	(± 300)	
VII	a	5 700	(± 200)	
	b	5 100	(± 000)	
	c	4 400	(± 100)	n = 3

Zusätzlich zur erwähnten Aufspaltung der Bande I findet man eine Aufspaltung der kleinsten Untereinheit in drei Banden (vgl. Bild 9). Eine dopppelte Aufspaltung der Bande VII findet man auch im Tris-Glycin-System (211). Das Auftreten von zusätzlichen Banden im Molekulargewichtsbereich oberhalb 68 000 ist schon bei Bild 15 diskutiert worden.

2.3.3. Immunpräzipitation mit IgG H

Abb. 17 zeigt das Bandenmuster eines Immunpräzipitats, das durch Reaktion eines Leberzellextrakts mit IgG H entstand. Es zeichnet sich durch eine Vielzahl von Banden aus. Ein Vergleich mit den Banden isolierter Cytochromoxidase im gleichen Gelsystem erlaubt jedoch die zweifelsfreie Zurodnung der Banden im Immunpräzipitat.
Ob es sich bei den restlichen Banden um Proteine aus spezifischen oder unspezifischen Fällungen handelt, ist unklar.

Allerdings sollte man berücksichtigen, daß bei allen Immunfällungen in dieser Arbeit Bedingungen eingehalten wurden, die als geeignet beschrieben worden sind (205), unspezifische Mitfällungen zu vermeiden.

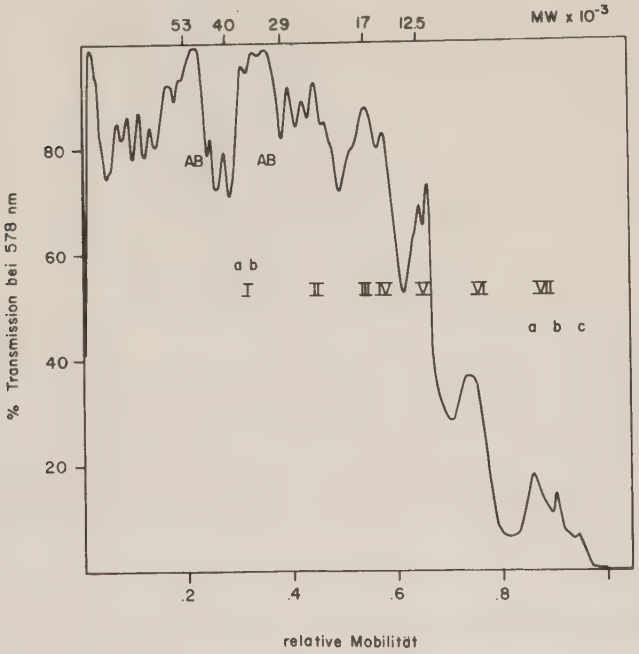


Abb. 17

SDS-Gel (Swank-Munkres) eines Immunpräzipitats aus einem Zellextrakt mit IgG H

Zellen wurden in 20 mM Na-Phosphat 150 mM NaCl 1% Triton X-100 pH 7,2 gelöst. 4 ml des Extrakts (= 8 mg Protein) wurden mit 0,6 ml IgG H (41 mg/ml) inkubiert. Die gewaschenen Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE nach Swank-Munkres aufgetrennt und auf Protein angefärbt.

2.4. Titerbestimmungen

Das optimale Antigen/Antikörperverhältnis wurde aufgrund der Menge des gebildeten Immunsediments abgeschätzt. Diese Methode wird zu diesem Zweck zwar in der Literatur allgemein verwendet, hat aber den Nachteil, infolge nichtpräzipitierender Antikörper (203) generell eine zu hohe Antikörpermenge im Verhältnis anzuzeigen. Außerdem läßt sich kaum ausschließen, daß die gemessene Präzipitationskurve die Summe mehrerer unabhängiger Präzipitationen darstellt (201,202). Diese Möglichkeit läßt sich nur durch kreuzweise Absorption von Antigen und Antikörper ausschließen. Schließlich ist es noch möglich, daß ein Antigen infolge unzureichender Konzentrationsverhältnisse nicht erfaßt wird.

2.4.1. Serum A

Abb. 18 zeigt die Titrationskurve eines Zellextrakts mit Antiserum A. Nach Heidelberger (195) sollte erwartet werden, daß die Titrationskurve ein Maximum durchläuft. Für das in Abb. 18 gezeigte abweichende Verhalten bieten sich zwei Erklärungen an:

a) die Avidität der Antikörper ist sehr gering (203),
b) es überlagern sich zwei oder mehrere Präzipitationskurven.

Ob und in welchem Ausmaß die beiden Möglichkeiten zutreffen, kann nur durch Verwendung monospezifischer Antikörper und kreuzweiser Absorption von Antigenen geklärt werden.
Legt man ein Molekulargewicht von 150 000 für die Cytochromoxidase aus Rattenleber (s.o.) und einen Oxidaseanteil am Zellprotein von 0,75% (213-215) zugrunde, so ergibt sich am Fällungsmaximum ein molares Antigen/Antikörperverhältnis von 1/24. Erwarten würde man nach Kabat und Mayer (212) ein Verhältnis von 1/10 bis 1/12.

Es ist somit nicht auszuschließen, daß unspezifische Proteine aus dem Serum oder spezifisch aus dem Zellextrakt gefällt wurden. Wie das Gel in Abb. 15 zeigt, müßten diese Proteine ein hohes Molekulargewicht besitzen.

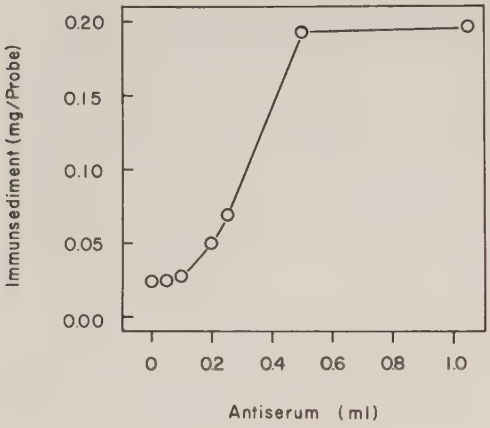


Abb. 18

Titration von Triton X-100-Zellextrakten mit Anti-Serum A

0,5 ml Zellextrakt (2 mg/ml) wurden mit unterschiedlichen Mengen Anti-Serum A in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml 18 h bei 4°C inkubiert. Das gebildete Präzipitat wurde abzentrifugiert, gewaschen und in 50 µl Puffer (10 mM Na-Phosphat, 2 mM EDTA, 4% SDS pH 6,8) gelöst. Von einem Aliquot dieser Lösung wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

2.4.2. IgG B

Abb. 19 zeigt die Präzipitationskurve von isolierter Cytochromoxidase und von einem Mitochondrienextrakt mit Immunglobulinen aus Serum B.
Bei der Präzipitation des isolierten Enzyms findet man auch ohne Zugabe von Antikörpern ein Sediment, daß vermutlich

eine unspezifische Aggregation der Oxidase darstellt und als Blindwert berücksichtigt werden muß. Die Präzipitationskurve zeigt ein deutliches Maximum, bei dem ein molares Antigen/Antikörperverhältnis von 1/7 vorliegt.

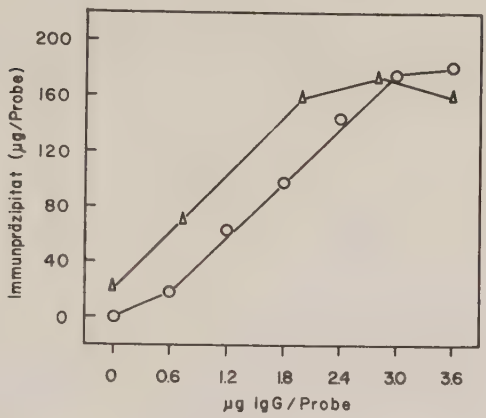


Abb. 19

Titration isolierter Cytochromoxidase und eines Mitochondrienextrakts mit IgG B

100 ul Mitochondrienextrakt (2 mg/ml) bzw. 10 µl Cytochromoxidase (1,9 mg/ml) wurden mit unterschiedlichen Mengen IgG B (30 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 220 µl bzw. 100 µl 14 h bei 4°C inkubiert. Das gebildete Immunpräzipitat wurde abzentrifugiert, gewaschen und in 20 µl Puffer (10 mM Na-Phosphat, 2 mM EDTA, 4% SDS pH 6,8) gelöst. Von einem Aliquot dieser Lösung wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Mitochondrienextrakte ○ , Cytochromoxidase △

Ob die Präzipitationskurve mit Mitochondrienextrakt als Antigenquelle ebenfalls ein Maximum durchläuft, läßt sich nicht entscheiden. Der Einsatz größerer IgG-Mengen war nicht vertretbar, da nur geringe Mengen an Immunglobulin zur

Verfügung standen. Das molare Antigen/Antikörperverhältnis liegt mit 1/29 in der gleichen Größenordnung wie bei dem Einsatz von Serum A, damit jedoch ebenfalls weit höher als bei isolierter Cytochromoxidase.
Verglichen mit der Reaktion unter Verwendung von Serum A ist durch den Einsatz von isolierten Immunglobulinen und isolierten, gewaschenen Mitochondrien auszuschließen, daß Serumproteine unspezifisch, oder daß cytoplasmatische Proteine spezifisch mitgefällt wurden.

2.5. Zeitabhängigkeit der Bildung von Immunpräzipitaten

Während die Reaktion von Antigenen mit Antikörpern eine der schnellsten bekannten biochemischen Reaktionen ist (die Geschwindigkeitskonstante liegt nahe dem theoretischen Limit von diffusionsbegrenzten Reaktionen (203)), ist die Bildung eines Präzipitats von den Reaktionsbedingungen und der Natur des Reaktionspaares abhängig. Sie wird mit 12 Stunden (209) bis 1, 2 Tagen oder länger (203) angegeben.
Abb. 20 zeigt, daß bei Verwendung von Antiserum A schon nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden die Präzipitation vollständig ist.
Somit sollte die bei den Immunfällungen (2.8.5.) eingehaltene Inkubationszeit von 24 Stunden ausreichend sein.

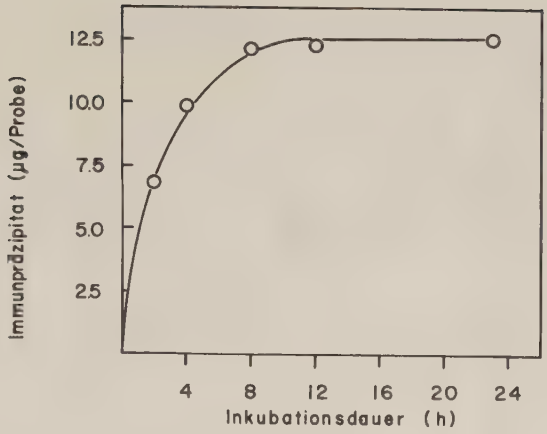


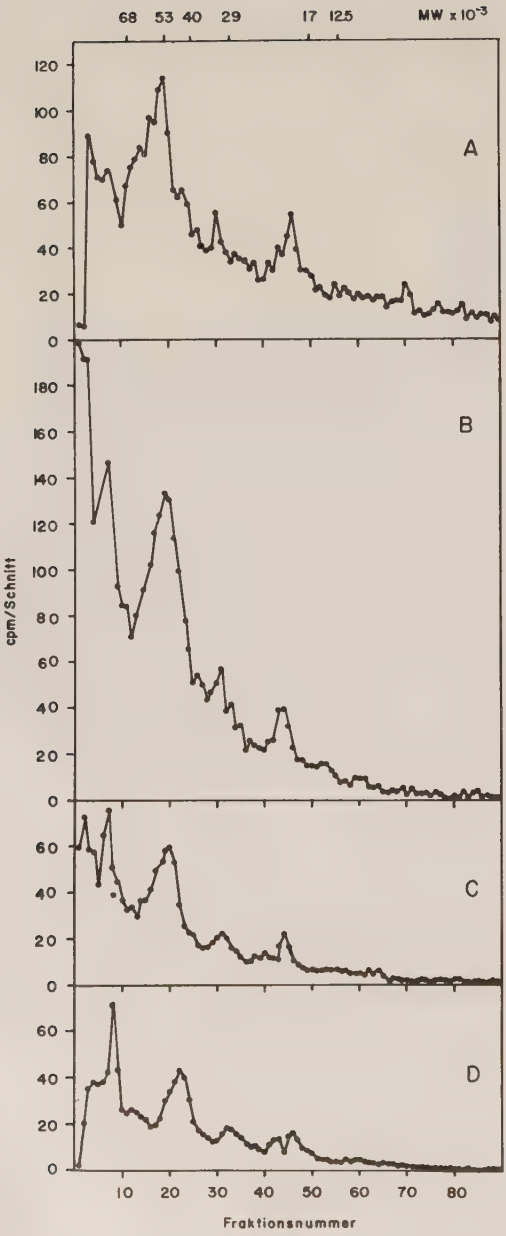
Abb. 20

Zeitabhängigkeit der Bildung von Immunpräzipitaten aus Zellextrakten mit Anti-Serum A

47,4 µl Zellextrakt (2 mg/ml) wurden mit 90,1 µl Anti-Serum A inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Präzipitate abzentrifugiert, gewaschen und in 50 µl Puffer (10 mM Na-Phosphat, 2 mM EDTA, 4% SDS pH 6,8) gelöst. Von einem Aliquot dieser Lösung wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

2.6. Titration von Zellextrakten mit IgG H

Wie sich später herausstellte, konnten auf SDS-Gelen von Immunpräzipitaten aus Zellextrakten mit Antiserum-A keine Banden der Cytochromoxidase sichtbar gemacht werden (Abb. 27). Unterschiedliche Fällungsoptima des Proteins unter dem


68 53 40 29 17 12.5 MW x 10⁻³
A
B
C
D
cpm/Schnitt
Fraktionsnummer

radioaktiven Hauptpeak und der Cytochromoxidase bei weit auseinanderliegenden Antikörperkonzentrationen könnten eine Erklärung dafür sein. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden zu einer konstanten Menge Zellextrakt variable Mengen (bis zu einer Verdünnung von 1:30) IgG H gegeben. Wie aus Abb. 21 hervorgeht, ändern sich alle Peaks bei unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen gleichmäßig und stehen folglich mit der oben angeführten Erklärung nicht im Einklang.

Abb. 21

SDS-Gele (Swank-Munkres) von Immunpräzipitaten aus Zellextrakten mit unterschiedlichen Mengen IgG H
1,4 ml Zellen (24,5 mg/ml) wurden mit 100 µCi ^{3}H-Methionin in einem Gesamtvolumen von 1,6 ml inkubiert. Die Zellen wurden in 20 mM Na-Phosphat 150 mM NaCl 1% Triton X-100 pH 7,2 aufgelöst. Je 4 ml Extrakt (= 8 mg Protein) wurden mit variablen Mengen (A = 1,14 ml, B = 0, 38 ml, C = 0,114 ml, D = 0,038 ml) IgG H-Lösungen (41 mg/ml) inkubiert. Die gewaschenen Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE nach Swank-Munkres aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde in Gelschnitten bestimmt.

3. Biosynthese der Cytochromoxidase in isolierten Rattenleberzellen

3.1. Untersuchungen mit Antiserum A

Wie aus den Daten, Bildern und SDS-Gelen in Abschnitt 2 hervorgeht, war Serum A in der Lage, Cytochromoxidase aus Zellextrakten von isolierten Rattenleberzellen zu fällen.

Da zu dem Zeitpunkt, als die in Abschnitt 2 beschriebenen Untersuchungen von Serum A durchgeführt wurden, die Parameter für die Proteinsynthese noch nicht optimal waren, wurde erst zwei Monate später aus den Kaninchen Antiserum A gewonnen und verwendet. Wie Davis et al. (203) zeigen, nimmt der Antikörpertiter des Serums in dieser Zeitspanne kaum ab, zumal auch zwischenzeitlich mehrfach geboostert wurde. Man konnte also davon ausgehen, daß sich Titer und Spezifität des Antiserums nur unerheblich während der dazwischenliegenden zwei Monaten geändert haben.

3.1.1. Kinetik des Einbaus von ^{14}C-Leucin in immunpräzipitierbares Material

Die Einbaukinetik von Leucin in Gesamtzellprotein und in Immunsedimente ist in Abb. 21 dargestellt. Die Kurven verlaufen parallel zueinander, wobei die Kinetik der Immunsedimente um ca. 68% unter der Kontrolle liegt. Diese Parallelität ist in Übereinstimmung mit Poyton et al. (271), die zeigen konnten, daß Antikörper gegen Holo-Cytochromoxidase außer mit Subunit III mit allen anderen gereinigten Untereinheiten kreuzreagiert, die ebenso schnell markiert werden sollten wie das Gesamtprotein.

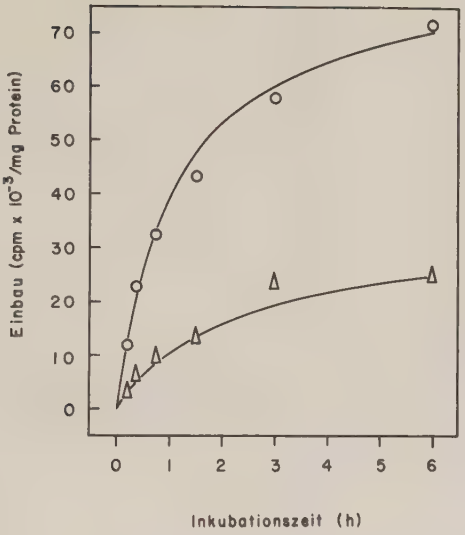
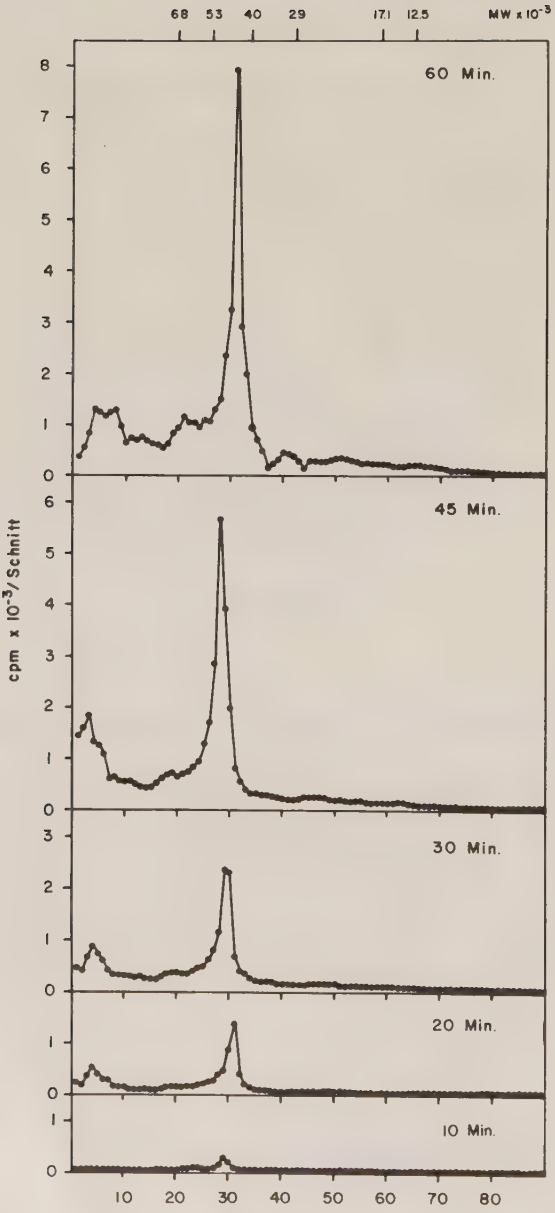


Abb. 22

Kinetik des Einbaus von ^{14}C-Leucin in immunpräzipitierbares Material

3 ml Zellen (7,6 mg/ml) wurden mit 1 µCi ^{14}C-Leucin (1 mCi/ml) in einem Gesamtvolumen von 32 ml inkubiert. Ein Teil der Proben wurde zu verschiedenen Zeiten mit 0,3 ml 3 M TCA-100 mM Leucin gestoppt, im Sediment wurde die Radioaktivität im Protein bestimmt. Der andere Teil der Proben wurde zu den angegebenen Zeitpunkten in 100 mM Na-Phosphat 1% Triton x-100 aufgelöst. 0,5 ml dieses Extrakts wurde mit dem gleichen Volumen Antiserum A inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren wurden die gewaschenen Immunpräzipitate in 0,1 ml 0,2 M NaOH gelöst. Jeweils ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung und zur Radioaktivitätsmessung entnommen. Gesamtprotein O , Immunsediment Δ


68
53
40
29
17.1
12.5
MW x 10⁻³
60 Min.
45 Min.
30 Min.
20 Min.
10 Min.
cpm x 10⁻³/Schnitt
10
20
30
40
50
60
70
80

3.1.2. SDS-Gelelektrophorese von Immunpräzipitaten

Die Radioaktivitätsverteilung auf SDS-Gelen von ^{35}S-markierten Immunpräzipitaten ist in Abb. 23 dargestellt. Überraschenderweise findet man auch nach 60 Minuten keine radioaktiven Peaks im Molekulargewichtsbereich der Cytochromoxidaseuntereinheiten (vgl.Abb. 15). Stattdessen erscheint ein einziger prominenter Peak mit MW ca. 48 kD, der schon nach einer Inkubationzeit von 10 Minuten erkennbar ist. Die Sensitivität dieses Peaks gegenüber Hemmstoffen der cytoplasmatischen und der mitochondrialen Proteinsynthese (CHI/Emetin bzw. CAP) ist in Abb. 24 gezeigt. Man erkennt, daß nur CHI in der Lage ist, die Markierung des Peaks zu verhindern. Dies bedeutet, daß das Protein im Cytoplasma synthetisiert wird.
Gegenüber der Kinetik des Gesamtproteins weist die Markierungskinetik des prominenten Peaks (Abb. 25 und Abb. 26) eine Verzögerung von etwas weniger als 10 Minuten auf.

Abb. 23
SDS-PAGE von Immunpräzipitaten aus ^{35}S-Methionin-markierten Zellextrakten mit Antiserum A
10 ml Zellen (7,5 mg/ml) wurden in einem Gesamtvolumen von 10,6 ml mit 200 µCi ^{35}S-Methionin inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Inkubation durch Zusatz von 20 ml eiskaltem Inkubationmedium 10 mM Methionin gestoppt. Die gewaschenen Proben wurden mit 100 mM Na-Phosphat 1% Triton X-100 extrahiert. 3 ml dieses Extrakts wurden mit dem gleichen Volumen Antiserum A inkubiert. Die SDS-PAGE der gewaschenen Immunpräzipitate wurde nach dem System Weber-Osborn durchgeführt.

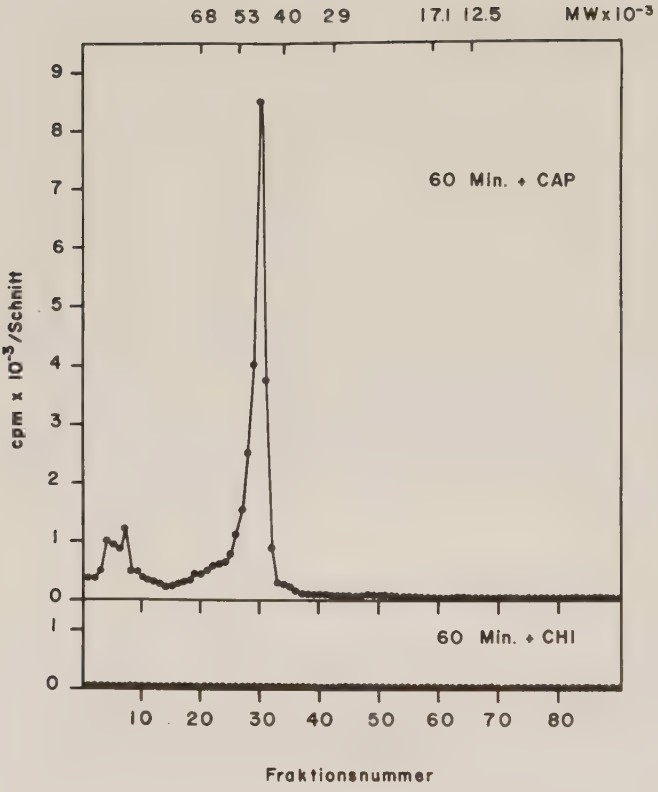


Abb. 24

Wirkung von Hemmstoffen auf die Markierung von Immunpräzipitaten

Es gilt die Legende zu Abb. 23. Die Hemmstoffkonzentrationen während der Inkubation betragen: CHI: 1 µMol/ml, Emetin: 0,33 µMol/ml und CAP: 375 µg/ml.

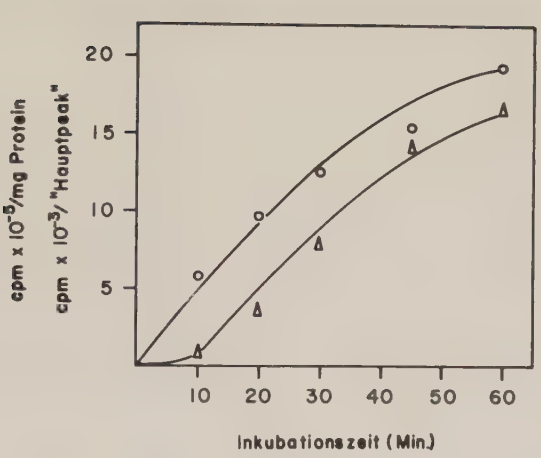
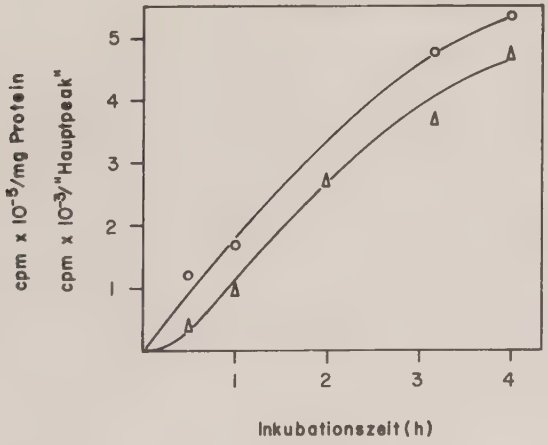


Abb. 25

Kinetik des Einbaus von ^{35}S-Methionin in Protein und"Hauptpeak"

Es gilt die Legende zu Abb. 23. Ein Aliquot der gewaschenen Zellen wurde zur Bestimmung von Radioaktivität im Gesamtprotein entnommen. Die gewaschenen Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Radioaktivität unter dem "Hauptpeak" bestimmt.

Protein ○ , "Hauptpeak" Δ



3.1.3. Korrelation des radioaktiven Hauptpeaks mit Proteinbanden der Cytochromoxidase

Abb. 27 zeigt den Vergleich der Radioaktivität und angefärbten Proteinbanden auf einem SDS-Gel. Die Banden der Cytochromoxidase sind in der Anfärbung nicht zu erkennen. Eine Erklärung wäre, daß beim Auflösen des Immunsediments, wobei ein unlöslicher Rest von ca. 25%, der nur 5-10% der Gesamtradioaktivität ausmachte, zurückblieb, Cytochromoxidase infolge ihrer ausgeprägten Neigung zur Aggregation nicht in Lösung gebracht werden konnte. Ebenso könnte unspezifisch mitpräzipitiertes Serumprotein eine Auflösung der Cytochromoxidase im Probenpuffer zur Gelelektrophorese verhindert haben.
Die beiden scharfen Proteinbanden stammen vom Antikörper, wie Vergleiche mit SDS-Gelen von reinen Antikörpern und auch das Molekulargewicht zeigen. Die Abbildung zeigt, daß sich der radioaktive Hauptpeak mit keiner Proteinbande korrelieren läßt. Möglicherweise ist dies aber dadurch bedingt, daß zu wenig Immunsediment auf das angefärbte Gel aufgetragen wurde.

Abb. 26
Kinetik des Einbaus von ^{35}S-Methionin in Protein und "Hauptpeak"
10 ml Zellen (3,8 mg/ml) wurden mit 100 µCi ^{35}S-Methionin in einem Gesamtvolumen von 10,6 ml inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Inkubation durch Zugabe von 20 ml eiskaltem Inkubationsmedium 10mM Methionin gestoppt. Ein Aliquot der gewaschenen Zellen wurde zur Bestimmung von Radioaktivität im Gesamtprotein entnommen. Der andere Teil wurde mit 100 mM Na-Phosphat 1% Triton x-100 extrahiert. 3 ml dieses Extrakts wurden mit dem gleichen Volumen Antiserum A inkubiert. Die gewaschenen Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Radioaktivität unter dem "Hauptpeak" bestimmt.

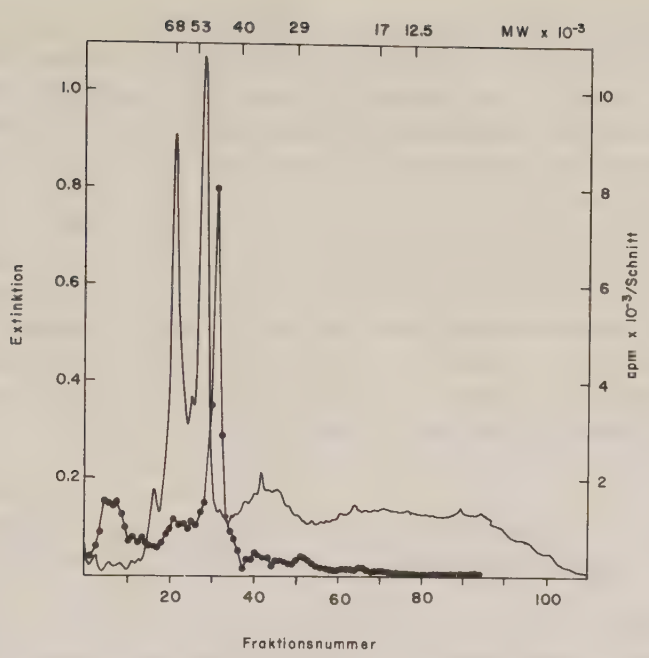


Abb. 27

Korrelation von Radioaktivität mit angefärbten Proteinbanden der Cytochromoxidase

Es gilt die Legende zu Abb. 23. Ein Aliquot des in Probenpuffer für die Gelelektrophorese aufgelösten Immunsediments aus Zellen, die 60 Minuten lang inkubiert worden waren, wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend angefärbt. Die Radioaktivitätsverteilung auf dem Gel nach 60 Minuten wurde Abb. 23 entnommen.

Eine Überprüfung im Ouchterlony-Test (Bild 7) zeigt, daß Antiserum A noch immer in der Lage ist, Cytochromoxidase als Antigen zu erkennen und zu präzipitieren. Ob das Serum gleichzeitig seine Spezifität geändert hat, läßt sich durch den Ouchterlony-Test nicht entscheiden.

3.2. Untersuchungen mit IgG B

Infolge des niedrigen Antikörpertiters und der begrenzten Menge von Antiserum A mußte in den folgenden Versuchen Antikörper aus Serum B eingesetzt werden.
Zur Vermeidung unspezifischer Mitfällungen von radioaktivem Material aus Zellextrakten durch Serumproteine wurde aus Serum B die isolierte IgG-Fraktion verwendet.

3.2.1. SDS-Gelelektrophorese von ^{3}H-Methionin-markierten Immunpräzipitaten

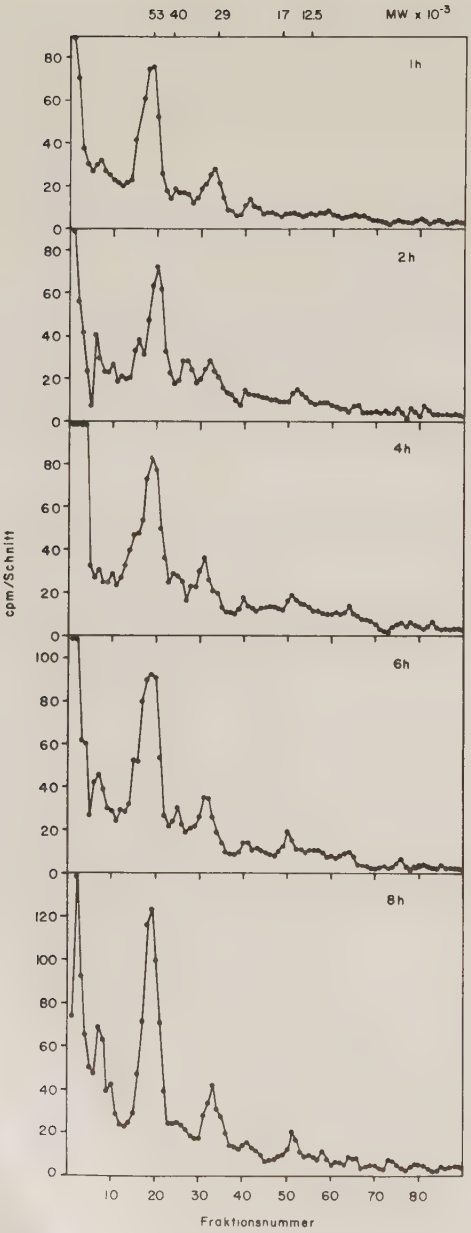
In Abb. 28 sind SDS/Harnstoff-Gele einer Einbaukinetik über 8 Stunden dargestellt. Man erkennt, daß der offensichtlich gleiche prominente Peak (in Gegenwart von Harnstoff allerdings mit MW 54 kD) wie bei der Fällung mit Antiserum A erscheint, der wie dort zeitabhängig anwächst. Daneben sind mehrere kleinere niedermolekulare Peaks zu sehen, die ebenfalls mit der Inkubationszeit anwachsen, sowie einige Peaks wechselnder Intensität im hochmolekularen Bereich. Die Peaks im niedermolekularen Bereich können Untereinheiten der Cytochromoxidase zugeordnet werden, wie Abb. 29 zeigt, bei der das Immunpräzipitat einmal angefärbt oder gezählt wurde. Am deutlichsten ist die Korrelation bei den Untereinheiten I, IV und VI. Die radioaktiven Peaks der anderen Untereinheiten heben sich zu wenig vom Background ab und lassen sich deshalb nicht eindeutig zuordnen. Der radioaktive Hauptpeak läßt sich wie schon vorher nicht eindeutig mit einem Protein auf dem angefärbten Gel korrelieren, obwohl sich in

diesem Bereich stark angefärbte Banden befinden. Die Auftrennung dieser Banden wird durch die Anwesenheit großer Mengen Antikörper stark beeinträchtigt.
Abb. 30 zeigt die Radioaktivitätsverteilung im SDS-Gel eines Immunpräzipitats, das in Gegenwart von CHI/Emetin inkubiert wurde. Der Vergleich mit Abb. 28 zeigt, daß die Hemmstoffe die Markierung aller immunpräzipitierbaren Proteine unterdrücken konnten und bestätigen somit die Experimente mit Antiserum A in Abb. 23. Offensichtlich werden auch die mitochondrial synthetisierten Banden der Cytochromoxidase in Gegenwart von CHI nicht markiert oder nicht zu immunpräzipitierbaren Komponenten integriert.

Abb. 28

Einbaukinetik von ^{3}H-Methionin in Immunpräzipitate aus Zellextrakten mit IgG B

1,4 ml Zellen (24,5 mg/ml) wurden mit 100 µCi ^{3}H-Methionin in einem Gesamtvolumen von 1,6 ml inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurde die Inkubation durch Zusatz von eiskaltem Inkubationsmedium (5 ml) 10 mM Methionin gestoppt. Die gewaschenen Zellen wurden mit 20 mM Na-Phosphat 150 mM NaCl 1% Triton x-100 extrahiert. 3,6 ml dieser Extrakte (=7,2 mg) wurden mit 0,7 ml IgG B-Lösung (75 mg/ml) inkubiert. Die gewaschenen, grünlichen Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE nach dem System von Swank-Munkres aufgetrennt und die Radioaktivitätsverteilung auf den Gelen bestimmt.


53 40 29 17 12.5 MW x 10^{-3}
1h
2h
4h
6h
8h
cpm/Schnitt
Fraktionsnummer

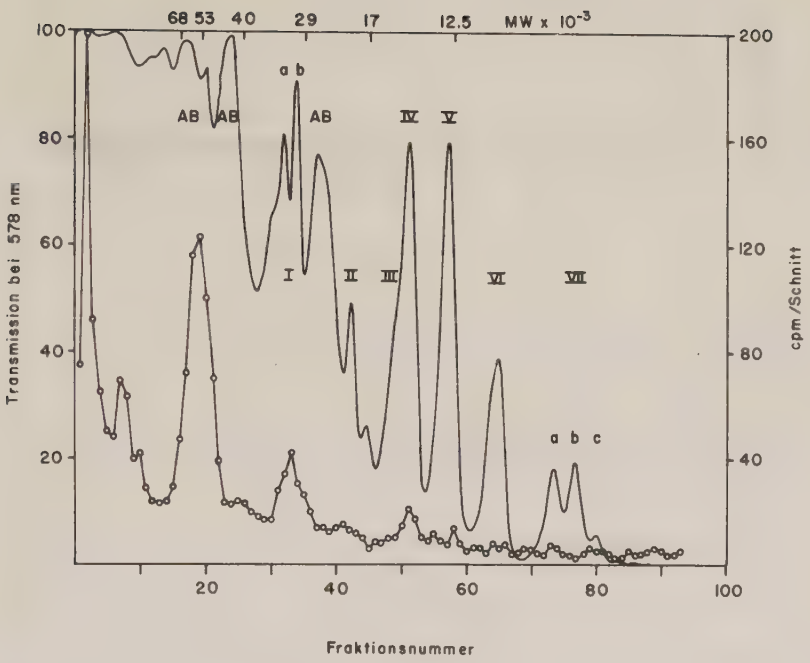


Abb. 29

Korrelation von Radioaktivität mit angefärbten Proteinbanden der Cytochromoxidase

Es gilt die Legende zu Abb. 28. Ein Aliquot der in Probenpuffer für die Gelelektrophorese aufgelösten Immunsedimente wurde im gleichen Gellauf durch SDS-PAGE nach Swank-Munkres aufgetrennt. Die Proteinbanden wurden angefärbt. Das Radioaktivitätsmuster ist Abb. 28 (8 h-Gel) entnommen.

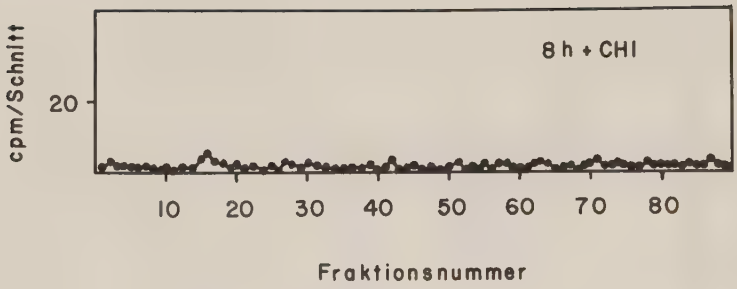


Abb. 30
Wirkung von CHI/Emetin auf die Markierung von Immunpräzipitaten
Es gilt die Legende zu Abb. 28. Abweichend davon wurde eine Probe mit CHI/Emetin 1 µMol/ml bzw. 0,35 µMol/ml inkubiert.

3.2.2. Kinetik des radioaktiven Hauptpeaks

In Abb. 31 ist die Kinetik des radioaktiven Hauptpeaks im Vergleich zur Proteinmarkierung dargestellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in Abb. 25 und 26 verlaufen die Kurven parallel zueinander

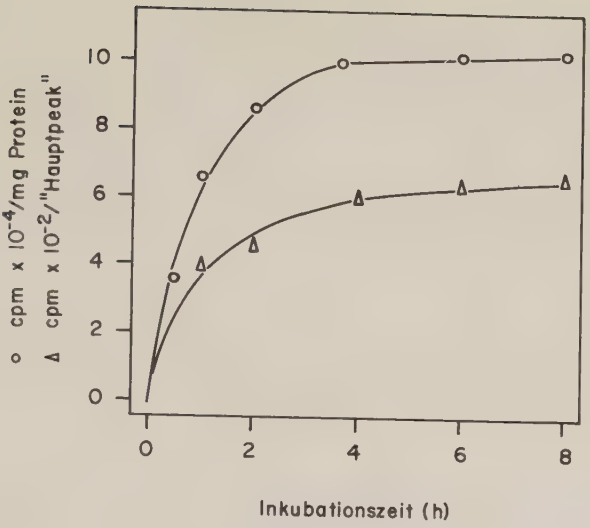


Abb. 31
Kinetik des Einbaus von ^{3}H-Methionin in Protein und "Hauptpeak"
Die Radioaktivität unter dem "Hauptpeak" wurde bei den Gelen in Abb. 28 bestimmt. Im gleichen Experiment wurden 6 Proben mit 1 µCi ^{3}H-Methionin inkubiert und zu den angegebenen Zeiten mit 50 µl 3 M TCA-100 mM Methionin gestoppt. Im Sediment wurde die Radioaktivität im Gesamtprotein bestimmt.

3.3. Puls-Chase Experimente

Der Verbleib neusynthetisierter Proteine läßt sich mit Hilfe von Puls-Chase-Experimenten untersuchen. Sie sind derart konzipiert, daß eine radioaktive Aminosäure nach einer definierten Zeit (Puls) durch eine hohe Konzentration an unmarkierter, gleicher Aminosäure stark verdünnt wird (chase). Durch die Verdünnung wird die Proteinsynthese

nicht gestört, aber die Menge von radioaktiver Aminosäure, die während des Chase noch eingebaut wird, ist praktisch zu vernachlässigen (in den folgenden Experimenten betrug der Verdünnungsfaktor $2x10^3$). Mit Hilfe von Puls-Chase-Experimenten sollte sich entscheiden lassen, ob der in Immunpräzipitaten immer gefundene Hauptpeak in Verbindung mit der Cytochromoxidase bzw. mit Untereinheiten des Enzyms gebracht werden kann.

3.2.1. Kinetik der ^{3}H-Methionin Radioaktivität nach verschiedenen Chase-Zeiten in Gesamtprotein und immunpräzipitierbares Material

Abb. 32 zeigt die Kinetik der Inkorporation von ^{3}H-Methionin in Gesamtprotein und immunpräzipitierbares Material. Zur Kontrolle ist der Einbau der Aminosäure ohne anschliessenden Chase ebenfalls wiedergegeben : er unterscheidet sich nicht von früheren Experimenten. Wird nach einem Puls von einer Stunde ein Chase mit 10 mM nichtradioaktivem Methionin gegeben, so nimmt die Radioaktivität im TCA-fällbaren Protein ständig ab. Dieser Prozeß repräsentiert mit großer Wahrscheinlichkeit die endogene Proteolyse.
Im Immunpräzipitat findet man zunächst keine Abnahme der Radioaktivität. Dieses Verhalten entspricht der Markierungskinetik des radioaktiven Hauptpeaks, wo man eine lag-Phase finden konnte (Abb. 25,26) und stellt wahrscheinlich die Zeit dar, die die Zelle zum Fertigstellen von Proteinen benötigt.

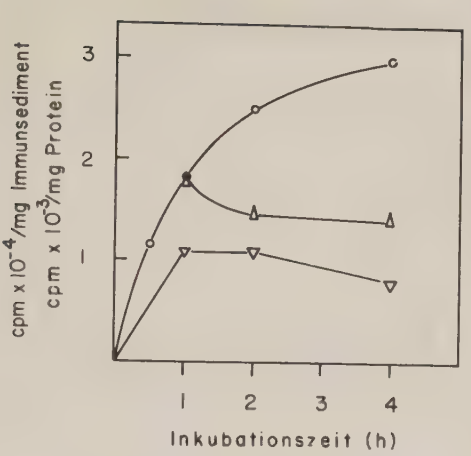
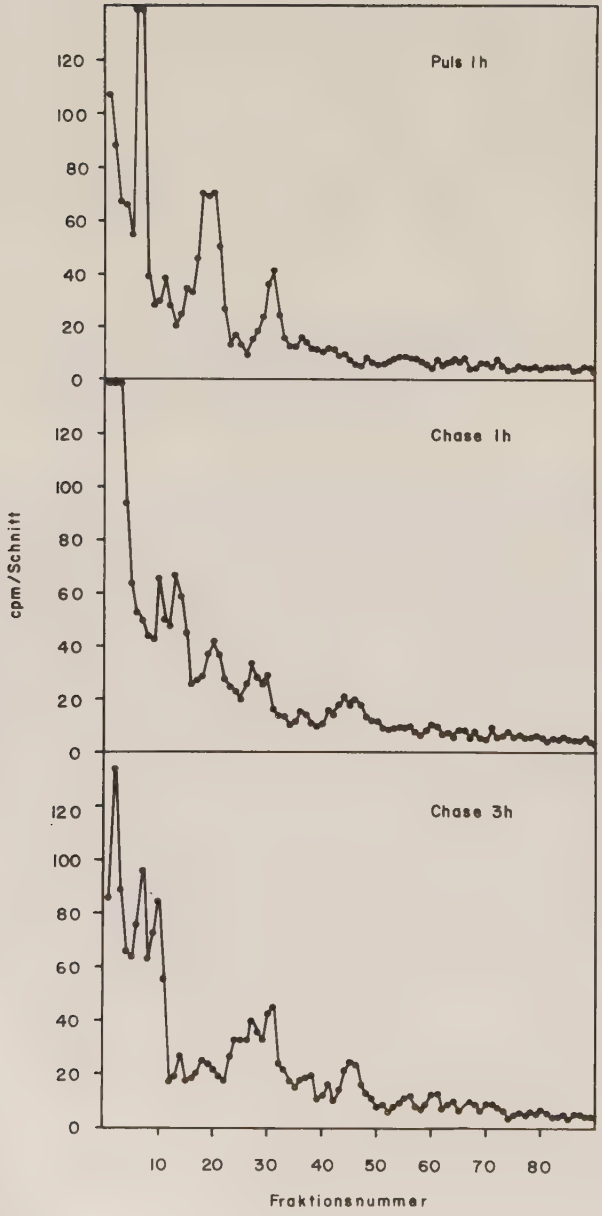


Abb. 32

Puls-Chase-Markierung von Gesamtprotein und Immunpräzipitaten

1,4 ml Zellen (13,0 mg/ml) wurden in einem Gesamtvolumen von 1,6 ml mit 200 µCi ^{3}H-Methionin inkubiert (Puls). Nach einer Stunde wurden 160 µl Inkubationsmedium 100 mM Methionin zugesetzt (Chase). Die Inkubation wurde durch Zusatz von 5 ml eiskaltem Inkubationsmedium 10 mM Methionin gestoppt. Die gewaschenen Zellen wurden mit 20 mM Na-Phosphat 150 mM NaCl 1% Triton x-100 extrahiert. Je 2,78 ml Extrakt wurden mit 0,541 ml IgG-Lösung (75mg/ml) inkubiert. Das gewaschene, grüne Immunsediment wurde in 30 µl Probenpuffer für die Gelelektrophorese nach Swank-Munkres aufgelöst. Jeweils ein Aliquot dieser Lösung wurde zur Protein- und Radioaktivitätsbestimmung entnommen. Alternativ wurden die Zellen mit 2 µCi ^{3}H-Methionin inkubiert. Die Inkubation wurde in diesen Fällen durch Zusatz von 50 µl 3 M TCA 100 mM Methionin gestoppt. Im Sediment wurde die Radioaktivität im Gesamtprotein bestimmt. Bei 2 Proben dieser Serie wurde zur Kontrolle die Pulsmarkierung ohne anschließenden Chase bis zu 4 Stunden fortgesetzt.

Immunsediment ▽ , Protein mit Chase △ , Protein ohne Chase ○


Puls 1h
Chase 1h
Chase 3h
cpm/Schnitt
Fraktionsnummer
0
20
40
60
80
100
120
10
20
30
40
50
60
70
80

3.2.2. SDS-PAGE von Puls-Chase-markierten Immunpräzipitaten

Die in Abb. 33 dargestellten Gele weisen eine hohe Radioaktivität im hochmolekularen Bereich auf. Dies könnte auf eine unvollständige Dissoziation der Cytochromoxidase im Probenpuffer zurückzuführen sein, da das Immunpräzipitat in diesem Fall nicht über Nacht mit Mercaptoäthanol inkubiert wurde.
Die Abb. 33 läßt erkennen, daß der radioaktive Hauptpeak unter Chasebedingungen rasch verschwindet. Die Abnahme der Radioaktivität erfolgt im Hauptpeak schneller als beim Gesamtprotein, wie der Vergleich mit Abb. 32 zeigt. Neben dem radioaktiven Hauptpeak erscheint bei Fraktion 30 ein weiterer Peak, der sich mit Untereinheit I der Cytochromoxidase korrelieren läßt. Die Höhe dieses Peaks ändert sich unter Chasebedingungen kaum. Anders die niedermolekularen Komponenten: dort ist besonders deutlich die Entwicklung eines Peaks bei Fraktion 45 während der Chasedauer festzustellen. Dieser Peak läßt sich Untereinheit IV der Oxidase zuordnen. Von den anderen anwachsenden niedermolekularen Komponenten kann nur noch der Peak bei Fraktion 60 der Untereinheit VI zugeordnet werden.

Abb. 33
SDS-PAGE Puls-Chase-markierter Immunpräzipitate
Es gilt die Legende zu Abb. 32. Die in Probenpuffer aufgelösten Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE nach Swank-Munkres aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde in Gelschnitten gemessen.

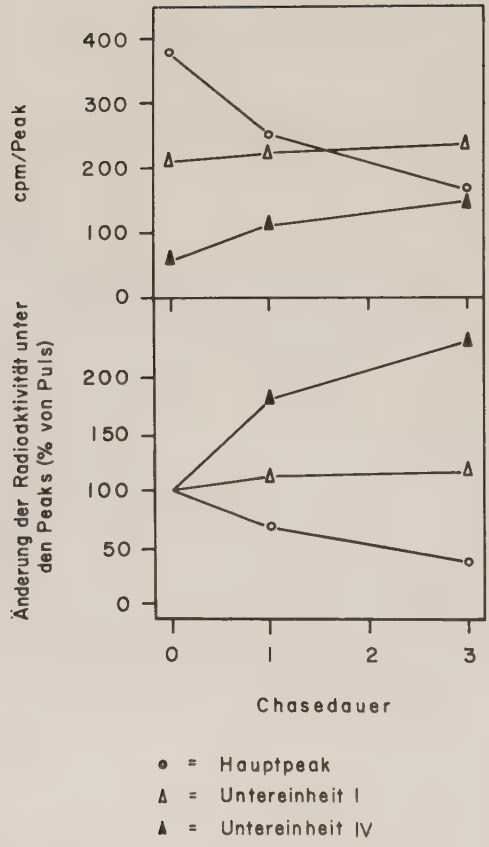


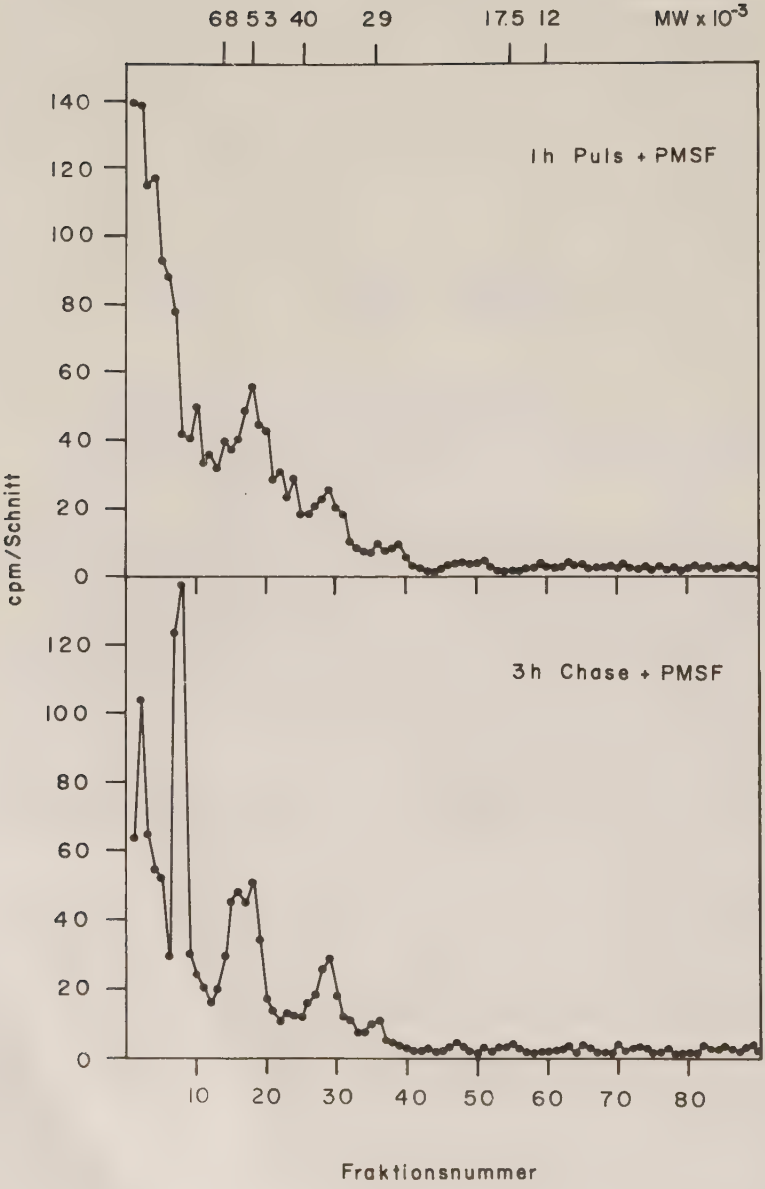
Abb. 34

Absolute und relative Änderungen der Radioaktivität unter dem "Hauptpeak" und den Untereinheiten I und IV der Gele aus Abb. 33

Die absoluten und die relativen Verschiebungen während des Chase der Radioaktivität unter dem Hauptpeak und den Cytochromoxidaseuntereinheiten I und IV sind in Abb. 34 wiedergegeben. Die starke Zunahme der Radioaktivität in Untereinheit IV um über 100% des Ausgangswertes ist im Vergleich zur Untereinheit I besonders auffallend. Addiert man in Abb. 33 die Zunahme der Radioaktivität in den Untereinheiten IV und VI und vergleicht sie mit der Abnahme der Radioaktivität im Hauptpeak, so stellt man fest, daß die Zunahme nach einer Stünde 47%, nach drei Stunden 45% der Abnahme im Hauptpeak beträgt und somit innerhalb der Fehlergrenzen einen zeitunabhängigen Wert liefert.
Bezieht man die Molekulargewichte der Untereinheiten IV und VI (= 24250 D) auf das Molekulargewicht des Hauptpeaks (= 54000 D), so ergibt sich ebenfalls ein Wert von 45%.
Die Übereinstimmung dieser Zahl mit den prozentualen Radioaktivitätsverschiebungen legt die Vermutung nahe, daß die Radioaktivität, die während des Chase aus dem Hauptpeak verschwindet, in den kleinen Untereinheiten der Cytochromoxidase auftaucht. Das würde bedeuten, daß das Protein, das durch den radioaktiven Hauptpeak repräsentiert wird, ein Vorläufer zumindest für die Untereinheiten IV und VI darstellt.

3.3.3. Wirkung von PMSF auf die radioaktive Markierung der Immunpräzipitate

PMSF ist ein Hemmstoff für Proteasen mit Serin im aktiven Zentrum. Wie aus Abb. 13A im 1. Abschnitt hervorgeht, übt der Inhibitor keine Wirkung auf die Proteinsynthese aus. Dies wird auch in Abb. 35 deutlich, wo im oberen Teil die Radioaktivität im Immunpräzipitat nach einstündiger Pulsmarkierung unter PMSF-Zusatz dargestellt ist.


68 53 40 29 17.5 12 MW x 10-3
1h Puls + PMSF
3h Chase + PMSF
cpm/Schnitt
0 20 40 60 80 100 120 140
0 20 40 60 80 100 120
10 20 30 40 50 60 70 80
Fraktionsnummer

Im unteren Teil der Abbildung ist die Radioaktivitätsverteilung nach einem dreistündigen Chase ebenfalls unter PMSF-Zusatz zu sehen. Ein Vergleich mit der Pulsmarkierung (Abb. 33) zeigt, daß unter PMSF-Zusatz keine wesentlichen Veränderungen der Peaks im Bereich der Cytochromoxidase während des Chase aufgetreten sind. PMSF konnte demzufolge sowohl den Abbau der markierten Peaks um 54 kD als auch die Zunahme der Radioaktivität in den Cytochromoxidase-untereinheiten verhindern.
Dieses Ergebnis könnte in Übereinstimmung mit der o.a. Vermutung so gedeutet werden, daß PMSF die Umwandlung des Hauptpeaks in die einzelnen Folgeprodukte (Untereinheiten der Cytochromoxidase) unterbindet.

3.4. Experimente zur Biosynthese der Cytochromoxidase "in vivo"

Die Signifikanz von Ergebnissen aus Experimenten "in vitro" sollte anhand von "in vivo"-Untersuchungen überprüft werden. Von besonderer Bedeutung war die Frage, ob die Existenz des in den bisherigen Experimenten gefundenen radioaktiven Hauptpeaks bestätigt werden konnte, da in isolierten Hepatocyten die Regulation des Proteinmetabolismus stark gestört ist (wie auch aus den Untersuchungen im 1. Abschnitt hervorgeht).

Abb. 35
Puls-Chase-Markierung von Immunpräzipitaten unter PMSF-Zusatz
Es gilt die Legende zu Abb. 32, wobei Puls und Chase-markierung unter PMSF-Zusatz (Endkonzentration 1 mM, 0,3% DMSO) erfolgten. Die gewaschenen Immunsedimente wurden wie in Abb. 33 weiterbehandelt.

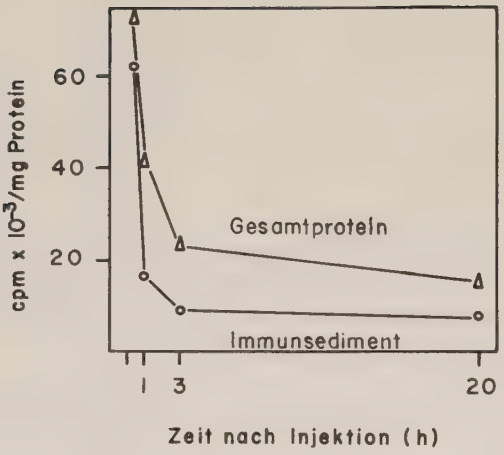


Abb. 36

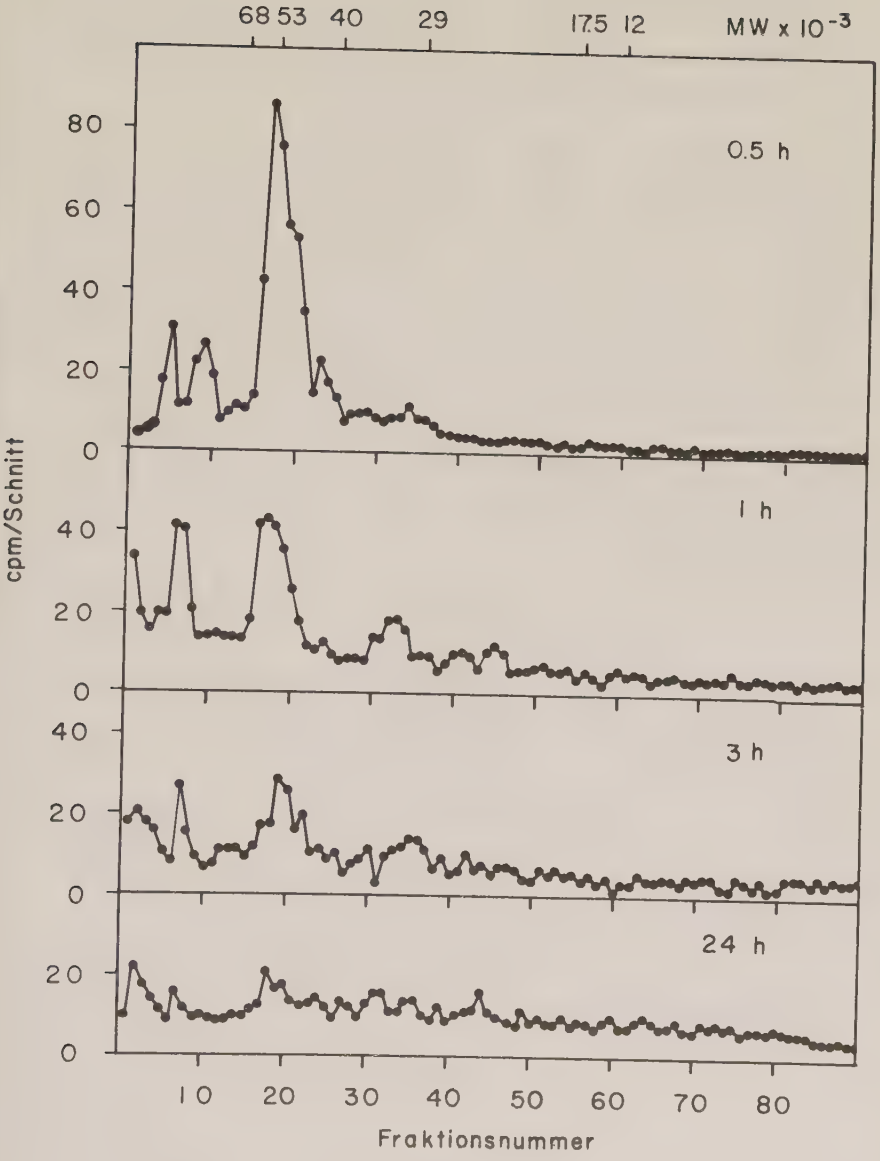
Kinetik des Einbaus von ^{3}H-Methionin in Gesamtprotein und Immunsedimente "in vivo"

Jedem Tier (ca.140 g) wurden 500 µCi ^{3}H-Methionin injiziert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Tiere betäubt, die Leber entnommen, blutfrei gewaschen und in 20 mM Na-Phosphat 150 mM NaCl 1% Triton x-100 pH 7,2 aufgelöst. Je 4 ml der Extrakte (= 8 mg Protein) wurden mit 0,6 ml IgG H-Lösung (41 mg/ml) inkubiert. Die gewaschenen Immunsedimente wurden in Probenpuffer für SDS-PAGE nach Swank-Munkres aufgelöst. Jeweils ein Aliquot wurde zur Radioaktivitäts- und zur Proteinbestimmung entnommen. Ein Aliquot der in Triton X-100 aufgelösten Leber wurde zur Protein- und zur Radioaktivitätsbestimmung von Gesamtprotein entnommen.

Abb. 37

SDS-PAGE ^{3}H-Methionin-markierter Immunsedimente "in vivo"

Es gilt die Legende zu Abb. 36. Die im Probenpuffer aufgelösten Immunsedimente wurden durch SDS-PAGE nach Swank-Munkres aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde in den Gelschnitten bestimmt.


68 53 40 29 17.5 12 MW x 10⁻³
0.5 h
1 h
3 h
24 h
cpm/Schnitt
Fraktionsnummer

Die Immunfällungen in den folgenden Experimenten wurden mit IgG H durchgeführt.

3.4.1. Kinetik des Einbaus von ^{3}H-Methionin in Gesamtprotein und Immunsedimente

Wie Abb. 36 zeigt, nimmt sowohl die Radioaktivität im TCA-fällbaren als auch parallel dazu im immunpräzipitierbaren Material rasch ab. Dies ist überraschend, da man erwarten sollte, daß die maximale Radioaktivität im Protein erst nach ca. 40 Minuten erreicht wird und dann langsam abfällt (263). Möglicherweise läßt sich die hier gefundene schnelle Abnahme auf die Injektion einer kleinen, sehr hoch markierten Menge an ^{3}H-Methionin zurückführen, die vorwiegend in Proteine mit hohem Turnover eingebaut und durch das endogene Methionin rasch verdünnt wird. Möglicherweise hat auch der Methioninpool in der Leber einen hohen Turnover, weil diese Aminosäure für jeden Peptidsynthesestart verwendet wird.
Abb. 37 zeigt die Radioaktivitätsverteilung in SDS/Harnstoff-Gelen von Immunpräzipitaten zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion der Radioaktivität.
Wie man sieht, wird die Existenz des radioaktiven Hauptpeaks bei 54 kD "in vivo" bestätigt. Die Höhe dieses Peaks nimmt rasch ab und hebt sich schon nach drei Stunden kaum mehr vom Untergrund ab.
Wie sich durch Berechnung zeigt, nimmt die Radioaktivitätsmenge unter dem Hauptpeak ebenso wie "in vitro" schneller ab als die Gesamtproteinmarkierung. Berechnungen der Radioaktivitätsverschiebungen unter den einzelnen Peaks in Analogie zu 3.3.2. sind hier nicht möglich, da sich die Peaks der Cytochromoxidaseuntereinheiten zu undeutlich vom Background abheben.

Das Fehlen von definierten markierten Banden der Cytochromoxidase 20 h nach der Injektion ist unerwartet. Der geringe Turnover der Cytochromoxidase und der hohe Methioningehalt eines cytoplasmatischen Vorläufers könnten jedoch die in Abb. 37 gezeigte Radioaktivitätsverteilung erklären.

IV Diskussion

1. Methode der Isolierung von Rattenleberzellen

Der Vorteil der in dieser Arbeit beschriebenen Technik zur Isolierung von Hepatocyten gegenüber anderen publizierten Methoden liegt in ihrer Einfachheit. Bei geringem apparativen Aufwand ist es möglich, in relativ kurzer Zeit (ca. 20 Min.) Leberzellen zu isolieren, wobei die Anforderungen auch durch einen ungeübten Präparator erfüllt werden können.
Ein Nachteil im apparativen Aufbau, wie er in 2.1.2. skizziert ist, liegt darin, daß das Perfusionssystem (Leber und Apparatur) nicht gemeinsam thermostatisiert wird. So erhält man je nach Raumtemperatur einen variablen Temperaturverlust in den Zuleitungen, was manchmal zur Bildung von Mikrogasblasen führt.
Die Verwendung von Perfusionsmedien, die nicht mit Carbogen äquilibriert sind, führt besonders bei der Perfusion mit Collagenasemedium zu hypoxischen Bedingungen in der Leber. Diese Hypoxie, sogar eine dreißigminütige Anoxie, ist jedoch für die Leber tolerabel und führt auch zu keinen Schädigungen der Zellen, wie mehrere Autoren übereinstimmend berichten (87,97,180).
Ein weiterer Nachteil der beschriebenen Methode besteht darin, daß der Experimentator keine objektiven Kriterien hat, wann die Digestion der Leber vollständig ist und die Perfusion beendet werden muß (die Perfusionsdauer ist variabel, sie richtet sich z.B. nach der Charge der Collagenase). Eine Registrierung des Rückflusses des Perfusionsmediums mit Hilfe eines Durchflußmessers, wie er von Wittman et al. (253) beschrieben wurde, könnte diesem Mangel abhelfen.
Zur Untersuchung der Zellintegrität ist der Ausschluß von Trypanblau, der in der Literatur am weitsten verbreitete

Test, da er Änderungen in der Zellstruktur direkt mißt.(Die Anfärbbarkeit der in dieser Arbeit verwendeten Zellen betrug 5-20%).
Die Überprüfung metabolischer Fähigkeiten, die ebenfalls in der Literatur empfohlen wird, kann zwar einen allgemeinen Überblick über die Qualität der Zellpräparation geben, die Daten unterliegen aber einer erheblichen biologischen Variationsbreite.
Der Kaliumgehalt könnte gleichfalls zur Beurteilung der zellulären Integrität herangezogen werden, aber Abgabe und Aufnahme von Kalium sind reversibel (87,114), im Gegensatz zu Strukturveränderungen, die man durch Trypanblau mißt.
Allerdings sollte man, wenigstens stichprobenartig, nicht auf eine elektronenoptische Untersuchung der Zellen verzichten, auch, um die Reversibilität der mit der Isolierung einhergehenden morphologischen Veränderungen zu überprüfen.
Derartige Untersuchungen lagen leider außerhalb der Möglichkeiten im Rahmen dieser Arbeit.
Da das pH-Optimum der Collagenase bei 7,5 liegt, und der pH des Mediums während der rezirkulierenden Perfusion rasch abnimmt (87,182,183), ist eine ständige, feine Regulierung des pH unerläßlich. Dies geschieht in der Regel durch dosierte Zugabe von NaOH (87), die die ständige Aufmerksamkeit des Experimentators erfordert, falls nicht automatische Geräte verwendet werden. Um dies in Zukunft zu vermeiden, wird die Verwendung von organischen starken Puffern wie z.B. HEPES (87) empfohlen.

2. Proteinsynthese in isolierten Rattenleberzellen

Die Überlegenheit des Inkubationsmediums nach Schreiber über herkömmliche Medien wird in Abb. 2 deutlich. Die Aminosäurekonzentrationen in diesen Medien sind für die Proteinsynthese in isolierten Rattenleberzellen optimiert (89) und liegen im physiologischen Bereich (216). Da höhere Aminosäurekonzentrationen in der Leber die Proteinsynthese stimulieren können (260), wird dies auch für isolierte Hepatocyten empfohlen (96). Nach Seglen (151) bewirken erhöhte Aminosäurespiegel im Inkubationsmedium lediglich eine Erhöhung der Harnstoffsynthese, nicht aber der Proteinsynthese. Aus diesen Gründen wurden höhere Aminosäurekonzentrationen in dieser Arbeit nicht verwendet.
Nach Abb. 3 ist eine Anreicherung des Inkubationsmediums mit Sauerstoff unter den verwendeten Inkubationsbedingungen nicht nötig, in Übereinstimmung mit anderen Autoren (87, 89,217). Dadurch kann der apparative Aufwand gering gehalten werden und auch schnelle Probennahmen werden möglich.
Die Wirkung der in Abb. 4 verwendeten Hemmstoffe der cytoplasmatischen und der mitochondrialen Proteinsynthese zeigt sich in einer 5-10%igen Hemmung der Proteinsynthese durch CAP und einer nahezu vollständigen Hemmung durch CHI/Emetin und steht damit in Übereinstimmung mit vielen Befunden in der Literatur (219, Übersicht: Ref.77).
Jedoch ist der Einsatz dieser Hemmstoffe trotz der großen Erkenntnisse, die man durch sie über die Biogenese der Mitochondrien gewann, problematisch.
So schreibt man CAP eine Hemmung des Elektronentransports, Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zu, es wird auch eine unvollständige Hemmwirkung auf die mitochondriale Proteinsynthese selbst bei hohen Dosen beschrieben. CHI auf der anderen Seite, verursacht neben ultrastrukturellen

Veränderungen an isolierten Hepatocyten (100) bei längerer Anwendung eine vollständige Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese (219), inhibiert die Asparaginsynthese, die Malatoxidation (220), die DNA-Synthese im Zellkern (221) und auch den Sekretionsvorgang von Plasmaproteinen in isolierten Hepatocyten (224). Auch eine Inhibierung der Proteolyse der Mitochondrien (225) wird berichtet.
Auch die Verwendung von Emetin als Hemmstoff der cytoplasmatischen Proteinsynthese, die aufgrund der abnehmenden Hemmwirkung von CHI bei längeren Inkubationszeiten (Abb. 5) notwendig wurde, ist umstritten.
Ibrahim et al. (226) fanden eine partielle Hemmung der mitochondrialen Proteinsynthese, was die Zweifel anderer Autoren (77) an der Spezifität dieses Hemmstoffes bestätigt.
Trotz dieser Nachteile schien die Verwendung dieser Hemmstoffe in dieser Arbeit gerechtfertigt, da andere Inhibitoren weit größere Nebenwirkungen bei geringerer Spezifität aufweisen.

Nach den Ergebnissen in 1.2. läßt sich die in Abb. 1 gezeigte Sättigungskinetik und die in Abb. 6 dargestellte nichtlineare Abhängigkeit des Einbaus von Leucin von der Proteinkonzentration durch eine Verdünnung der spezifischen Radioaktivität im Extracellulärraum bzw. im Precursorpool für die Proteinsynthese erklären. Diese Verdünnung wird bei höheren Proteinkonzentrationen schneller erreicht.
Diese Erklärung steht im Einklang mit Experimenten von Seglen (143), der eine "Linearisierung" der Einbaukinetik durch Erhöhung der extracellulären Aminosäurekonzentrationen zeigen konnte. Dies erklärt auch die verschiedenen Befunde in der Literatur über die Form der Einbaukinetik.
Es gibt eine Vielzahl von Literaturhinweisen, daß zur Berechnung der für die Proteinsynthese maßgeblichen

Aminosäurekonzentrationen die Konzentration im gesamten löslichen Zellkompartiment nicht herangezogen werden darf. Erlaubt ist dies möglicherweise beim Rattenherzen (228, 229), bei Lymphocyten (230) ist man sich jedoch nicht sicher (231). Von mindestens zwei getrennten Pools für Valin in der perfundierten Leber, von denen nur einer die Aminosäuren für die Proteinsynthese liefert, berichten Mortimore et al. (232), deren Daten neuerdings von Peavy et al. (234) in Frage gestellt werden. Ähnlich fanden Hod und Hershko (233) in Hepatomazellen aus Ratten zwei getrennte Pools, aus denen t-RNAs mit Valin beladen werden; nur einer davon ist intrazellulär lokalisiert. Auch Seglen (143) findet, daß in isolierten Rattenleberzellen mindestens zwei Aminosäurepools existieren, von denen einer expandierbar ist und die Aminosäuren für die Proteinsynthese liefert.
Auf der anderen Seite postulieren Hider et al. (235) für Rattenmuskel und Venroij et al. (236) für HeLa-Zellen, daß die Aminosäuren direkt aus dem extrazellulären Raum in Protein eingebaut werden.
Neuere Untersuchungen (237,238) in der Ratte "in vivo" führten zu dem Bild, daß die Aminosäuren weder ausschließlich aus einem intrazellulären noch ausschließlich aus einem extrazellulären Precursorpool kommen.
Die in dieser Arbeit beschriebene Methode der Isotopenverdünnung zur Bestimmung der Leucinkonzentration im Aminosäurepool für die Proteinsynthese macht eine Lokalisierung des Pools unnötig, da sie direkt die Konzentration, die während der Beladung der t-RNAs vorhanden ist, wiedergibt. Diese Methode berücksichtigt auch, daß die Konzentration sowohl durch die extrazellulär vorgegebenen als auch durch anderweitig wirksame Mengen an Leucin beeinflußt werden kann, obwohl sie nicht in der Lage ist, zwischen den einzelnen Einflüssen zu diskriminieren. Daneben zeichnet sich diese Methode durch eine große Sensitivität und durch einen geringen apparativen Aufwand aus.

Die auf die beschriebene Weise gewonnenen Daten für die Leucinkonzentration im Precursorpool für die Proteinsynthese lassen keine Entscheidung zugunsten der einen oder anderen der genannten Vorstellungen über die Natur des Precursorpools (extra- oder intrazellulär) zu, da in dieser Arbeit keine extra- und intrazellulären Aminosäurekonzentrationen gemessen wurden. Es gibt allerdings einige Hinweise, die die Identität des Precursorpools mit dem intrazellulären Gesamtleucinpool bezweifeln lassen. So finden Krebs et al. (123) in frisch isolierten Hepatocyten eine intrazelluläre Leucinkonzentration von 0,120 mM, die sich zwar mit derjenigen "in vivo" deckt, sich aber von dem in dieser Arbeit gefundenen Wert (0,055 mM) deutlich unterscheidet. Diese Vorstellung von der Nichtidentität der Pools wird durch Befunde von Seglen (151) gestützt, die einen kleineren als den gesamten intrazellulären Aminosäurepool als Vorläufer für die Proteinsynthese wahrscheinlich machen.

Eine Äquilibrierung des Precursorpools mit dem Extrazellulärraum kann nicht mit Sicherheit bewiesen werden, da die spezifischen Radioaktivitäten in den genannten Räumen unbekannt waren, wird aber durch den Vergleich der Daten in Abb. 10A mit den Aminosäurekonzentrationen, die die perfundierte isolierte Leber im Plasma einstellt, nahegelegt. Sie wird auch durch Studien von Kairallah et al. (254) und von Venroij et al. (239) bestätigt, die eine Äquilibrierung von Aminoacyl-t-RNAs mit den Aminosäuren im Extrazellulärraum fanden.

Die Berechnung der Proteinsyntheserate beruht außer auf der diskutierten Annahme, daß der Precursorpool mit dem extrazellulären Raum äquilibriert, auch auf der Annahme, daß die Reinkorporation von Leucin vernachlässigt werden kann. Diese Annahme stützt sich auf Daten von Mortimore et al. (232) und Fern et al. (255) sowie auch von Mac Givan et al. (164). Schließlich ist auch die nur kurze

Inkubationszeit von 10 Minuten zu berücksichtigen, die ebenfalls eine Reinkorporation vernachlässigbar erscheinen läßt.

Zusammen mit den Daten über die Harnstoffsynthese ergeben die Werte der Proteinsynthese in den hier verwendeten Zellen, ein Bild des Proteinmetabolismus, der in die katabole Richtung verschoben ist. Dieser Befund wird durch andere Autoren (143,146,147,151,174) bestätigt.
Während die Ursachen der gegenüber dem Organ deutlich erniedrigtn Proteinsyntheserate bis heute noch völlig ungeklärt sind, waren Versuche, den erhöhten Proteinkatabolismus zu verstehen und zu reduzieren weniger erfolglos. So fand Seglen (104,151), bestätigt durch Hopgood et al. (174), daß Ammoniumionen die Proteindegradation auf die Hälfte reduzieren können, wahrscheinlich durch eine inhibitorische Wirkung auf die Lysosomen. Auch andere, in Abb. 13 gezeigte Agentien wurden als Hemmstoffe des Proteinabbaus beschrieben (174).
Während diese Wirkung der genannten Agentien durch die Daten in Abb. 13B bestätigt wird, zeigt der Vergleich mit Abb. 13A, daß sie nicht in der Lage sind, auch Einfluß auf die Proteinsynthese auszuüben. Der naheliegende Schluß, daß die Proteinsynthese von der Proteindegradation unabhängig reguliert wird, wird durch Experimente von Goldberg (251), Schimke (252), Garlick (257) und Scornic (258) bestätigt.
Eine Ausnahme in der Reihe der erwähnten Inhibitoren scheint Ammoniumchlorid zu bilden, das eine zeitabhängige Minderung auch des Einbaus von Leucin in Protein bewirkt (Abb. 12). Da dieses Salz das lysosomal-proteolytische System inhibiert (s.o.), könnte man sich auch eine entsprechend negative Wirkung auf die Signalpeptidase im Modell der Blobel-Dobberstein-Hypothese (259) vorstellen.

Die ausbleibende Wirkung von Insulin sowohl auf die Proteinsynthese wie auch auf die Harnstoffproduktion legt die Vermutung nahe, daß die Hepatocyten die entsprechenden Hormonrezeptoren verloren haben. Diese

Vermutung wird durch die Literatur gestützt (117), wo eine destruktive Wirkung durch Proteasen auf Hormonrezeptoren an isolierten Zellen berichtet wird. Käufliche Collagenase enthält (je nach Herstellung) erhebliche proteolytische Aktivitäten (87). Aber auch die ungenügende Supplementierung des Vorperfusions und Inkubationsmediums durch Albumin könnte die Zerstörung der Rezeptoren bedingt haben (256).

3. Immunologische Untersuchungen von Antikörpern gegen Cytochromoxidase

Wie der Vergleich mit Antiseren gegen Cytochromoxidase aus niederen Eukaryonten zeigt (208,272), weisen die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren einen sehr geringen Gehalt an Cytochromoxidaseantikörpern auf. Möglicherweise ist dies auf die nahe phylogenetische Verwandtschaft von Ratte und Kaninchen zurückzuführen. In diesem Fall könnte die Immunisierung von Hühnern, Ziegen oder Pferden Abhilfe schaffen. Auch ein inadäquates Immunisierungschema könnte den niedrigen Antikörpertiter bedingt haben. Diese Möglichkeit läßt sich nur durch langwierige Studien überprüfen. Sicher hat auch bei der Produktion von Antiserum A die Verwendung des als Adjuvans mäßig wirksamen Aluminiumhydroxids eine Rolle gespielt.

Bei der Produktion von Antikörpern gegen ein Antigen ist dessen "Reinheit" von entscheidender Bedeutung. Bei dem in Bild 9 dargestellten SDS-Gel der in dieser Arbeit als Immunogen verwendeten Cytochromoxidase sind im hochmolekularen Bereich einige zusätzliche Banden zu sehen, die vermutlich Aggregate verschiedener Cytochromoxidaseuntereinheiten darstellen (7,210). Diese Interpretation stützt sich auch auf die Methode der Isolierung der Cytochromoxidase, bei der von isolierten, mehrfach gewaschenen Mitochondrien ausgegangen wird (6,7), so daß es unwahrscheinlich ist, daß in der Cytochromoxidasepräparation noch cytosolische Proteine vorhanden sind. Ebenso unwahrscheinlich ist die Anwesenheit kontaminierender Mitochondrienproteine, die neben einem identischen Lösungsverhalten in verschiedenen Detergentien auch die gleiche Oberflächenladung und das gleiche Fällungsverhalten bei den Ammonsulfatfraktionierungen wie die Cytochromoxidase aufweisen müßten. Man kann somit davon ausgehen, daß die als Immunogen

verwendete Cytochromoxidase "rein" war und lediglich die entsprechenden Antikörper in den Kaninchen induzieren konnte.

Die Ouchterlony-Untersuchungen mit diesen Antikörpern lassen erkennen (Bild 1 und 8), daß zumindest einige antigene Determinanten der Cytochromoxidase in SDS-haltigen Puffern erhalten blieben.
Werner (209) hat ebenfalls eine Konservation von antigenen Determinanten während der SDS-Behandlung festgestellt und auch andere Autoren(207) berichten über immunologische Untersuchungen in ionischen Detergentien.
Bei einem Molekulargewicht von ca. 150 000 würde man ein molares Antigen/Antikörperverhältnis von 1/10 bis 1/12 erwarten (212). Diese Werte stellen allerdings Minimalwerte dar (203,205), die für lösliche Proteine gelten. Für Membranproteine sollte man ein höheres Verhältnis erwarten (207).
Zur Erklärung der Diskrepanz der gefundenen Antigen/Antikörperverhältnisse bei Verwendung unterschiedlicher Antigenquellen bieten sich zwei Möglichkeiten an:

a) beim Einsatz von Zell- oder Mitochondrienextrakten werden "beliebige" Proteine unspezifisch mitgefällt,
b) die Verwendung isolierter Oxidase führt zu einer Unterschätzung des Antigen/Antikörperverhältnisses.

Wie die Abbildungen 15 und 16 zeigen, müßten die "beliebigen" unspezifisch mitgefällten Proteine ausnahmslos hohe Molekulargewichte aufweisen, falls die erste Möglichkeit zutrifft. Dies würde dann zu einer Überschätzung des Antigen/Antikörperverhältnisses führen.
Zu einer Unterschätzung des Verhältnisses (zweite Möglichkeit) führt die Annahme, daß isolierte Oxidase insbesondere nach Lagerung in tiefgefrorenem Zustand in multimeren Aggregaten vorliegt, die mit relativ weniger Antikörpermolekülen ein Präzipitat liefern. Multimere Aggregate isolierter Oxidase sind in den unterschiedlichsten Detergentien beschrieben worden (5,17,213). Diese Interpretation wird auch

dadurch gestützt, daß in Abb. 19 bei der Präzipitation isolierter Oxidase ein Sediment selbst ohne Zusatz von Antikörpern auftrat. Eine Entscheidung zugunsten der einen oder anderen der genannten Interpretationen kann nur durch Verwendung monospezifischer Antikörper gegeben werden.

Trennt man die Immunpräzipitate, die aus Zellextrakten mit den beschriebenen Antikörpern erhalten werden, auf SDS/ Harnstoff- Gelen auf (Abb. 16,17, Ref. 210), so findet man eine dreifache Aufspaltung der kleinsten Untereinheit.
Die Bedeutung dieses Phänomens ist völlig unklar. Steffens und Buse (33) berichten ebenfalls die Aufspaltung der Untereinheit VII aus Rinderherz in drei Banden mit jeweils verschiedenen N-termini. In einer neueren Arbeit findet auch Werner (209) eine Aufspaltung der kleinsten Subunit der Cytochromoxidase aus N. crassa in 2 Banden.
Die Molekulargewichte der Untereinheiten der Cytochromoxidase in Abb. 15 und 16 sind voneinander leicht verschieden. Dies ist, wie Capaldi (34) gezeigt hat, auf die unterschiedlichen Gelsysteme zurückzuführen.

4. Biosynthese der Cytochromoxidase

Die beschriebenen Untersuchungen über die Biosynthese der Cytochromoxidase haben zum einen den Nachteil, daß in die Untereinheiten nicht genügend Radioaktivität eingebaut werden konnte, zum anderen, daß für die Experimente drei Antikörperpräparationen aus verschiedenen Kaninchen verwendet wurden.
Der erste Nachteil ist zum Teil auf das verwendete System zurückzuführen, das im Vergleich zu niederen Eukaryonten wie z.B. N. crassa oder S. cerevisiae eine wesentlich niedrigere Syntheserate der Proteine aufweist, die zudem in den isolierten Zellen nur ca. 37% der Rate "in vivo" beträgt. Zum Teil beruht die niedrige Radioaktivität in den Gelschnitten auch auf dem verwendeten Gelsystem, das die applizierbare Proteinmenge limitiert, wenn eine scharfe Trennung erreicht werden soll. Berücksichtigen sollte man dabei auch das Antigen/Antikörperverhältnis von ca. 1/26.

Andere Methoden wie Flachbettgelelektrophorese, Autoradiographie oder Affinitätschromatographie können möglicherweise in Zukunft diesen Schwierigkeiten abhelfen.
Der zweite Nachteil, der niedrige Antikörpertiter der Seren wurde schon diskutiert.
Wie aus den Experimenten unter Verwendung von Antiserum A, besonders aus der Abb. 26 hervorgeht, konnten auf SDS-Gelen keine Cytochromoxidasebanden sichtbar gemacht werden. Mehrere Möglichkeiten der Erklärung bieten sich an:

a) das Antiserum hat seine Spezifität geändert,
b) die gewählten Antigen- und Antikörperkonzentrationen bei der Immunfällung haben nicht ausgereicht, die Cytochromoxidase zu präzipitieren,
c) beim Auflösen der Immunsedimente konnte die Cytochromoxidase nicht in Lösung gebracht werden.

Die erste Möglichkeit scheint unwahrscheinlich, da das Serum die Fähigkeit, Cytochromoxidase zu erkennen und zu präzipitieren, nicht verloren hat. Dies beweist der Ouchterlony-Test in Bild 7. Auch die zweite Erklärung scheint unzutreffend zu sein, wie man Abb. 21 entnehmen kann. Dort wurden das Protein des Hauptpeaks und die Cytochromoxidase offensichtlich zugleich gefällt. Da aber für dieses Experiment IgG H eingesetzt wurde, läßt sich nicht mit Sicherheit ausschließen, daß Antiserum A unter den gleichen Inkubationsbedingungen anders reagiert hätte.
Die letzte Möglichkeit scheint die wahrscheinlichste zu sein, zumal die Cytochromoxidase aus Rattenleber unter Bedingungen, die zur vollständigen Dissoziation von Membranproteinen empfohlen werden (164-166), irreversibel Aggregate bildet, die zum Teil nicht mehr ins Gel einwandern (7). Damit im Einklang steht, daß der im Probenpuffer unlösliche Rest mehr Radioaktivität enthielt, als von der Cytochromoxidase allein maximal zu erwarten war.
Der Syntheseort des Proteins, das den radioaktiven Hauptpeak repräsentiert, muß das Cytoplasma sein, wie die ausschließliche Sensitivität gegenüber CHI/Emetin beweist (Abb. 23,30). Abb. 30 zeigt aber auch, daß die drei großen Untereinheiten, die in Analogie zur Cytochromoxidase in allen bisher untersuchten Organismen wahrscheinlich in den Mitochondrien synthetisiert werden, ebenfalls nicht in Gegenwart von CHI/Emetin erscheinen. Das deckt sich mit Experimenten von Koch (35) an X. laevis-Oocyten, wo nur nach einer Vorinkubation von 62 Stunden unter CAP-Zusatz während einer nachfolgenden Blockade der cytoplasmatischen Synthese durch CHI eine Markierung der mitochondrial synthetisierten Untereinheiten gezeigt werden konnte. Ein sehr kleiner, schon nach kurzer Zeit bei Hemmung der cytoplasmatischen Synthese erschöpfter Pool an cytoplasmatisch synthetisierten Untereinheiten könnte eine Erklärung für die genannten Befunde sein. Eine Markierung mitochondrial synthetisierter Untereinheiten nur in Gegenwart ihrer cyto-

plasmatischen Partnerproteine wird auch von anderen Autoren (26,65,72,73,261,262) berichtet.
Es besteht die Möglichkeit, daß der radioaktive Hauptpeak in SDS-Gelen von Immunpräzipitaten aus Zellextrakten mit Antiserum A eine unspezifische Mitfällung durch Serumproteine darstellt. Das Erscheinen des radioaktiven Hauptpeaks unter Verwendung sowohl von IgG B als auch von IgG H schließt diese Möglichkeit jedoch aus.

Die Puls-Chase-Experimente (Abb.33,34) zeigen, daß die Markierungskinetik der kleinen Cytochromoxidaseuntereinheiten von der Kinetik des Gesamtimmunpräzipitats deutlich abweicht: während die Radioaktivität im Gesamtimmunpräzipitat abnimmt, nimmt sie bei den Enzymuntereinheiten zu. Dieses Verhalten läßt sich durch die Annahme der Synthese eines Precursors erklären, der in einem Nachfolgeschritt in die einzelnen Untereinheiten prozessiert wird. Als Precursor käme der Hauptpeak in Betracht, der in Abb. 33 eine typische Precursorkinetik zeigt. Die Beteiligung proteolytischer Enzyme bei der Umwandlung in die funktionalen Untereinheiten wird durch Abb. 35 nahegelegt, wo gezeigt wird, daß PMSF, ein Proteaseninhibitor, das Entstehen radioaktiv markierter Untereinheiten verhindern kann, obwohl er die Proteinsynthese nicht beeinflußt. Gleichzeitig kann PMSF den Abbau des Proteins unter dem radioaktiven Hauptpeak unterbinden. Obwohl eine Konversion dieses Proteins in die Untereinheiten der Cytochromoxidase eine naheliegende Annahme auch aufgrund einer quantitativen Auswertung der Radioaktivitätsverschiebungen (Abb. 34,33) wäre, können diese Experimente den Beweis dafür nicht liefern.
Das Erscheinen eines radioaktiven Hauptpeaks vom MW 54 kD wird in Abb. 37 auch "in vivo" sichergestellt. Ebenso wie in den "in vitro"-Experimenten verschwindet die Radioaktivität unter dem Hauptpeak schneller als die Gesamtproteinmarkierung, zeigt also eine typische Precursorkinetik.

Aufgrund der beschriebenen und diskutierten Ergebnisse wird die Vermutung geäußert, daß der radioaktive Hauptpeak, der in SDS-Gelen von Immunpräzipitaten aus Zellextrakten mit Antikörper gegen Cytochromoxidase auftritt, ein Protein repräsentiert, das ein Vorläufer der cytoplasmatisch synthetisierten Untereinheiten der Cytochromoxidase darstellt.

Folgende Argumente lassen sich zugunsten dieser Vermutung anführen:

a) das immunologische Verhalten:

Aus den im immunologischen Teil diskutierten Gründen kann man davon ausgehen, daß die Cytochromoxidasepräparation "rein" war und lediglich die entsprechenden Antikörper im Kaninchen induzieren konnte.

Da der "Precursor" durch die Antikörper (Serum A,IgG B, IgG H) gegen reine Cytochromoxidase ebenfalls präzipitiert wird, läßt sich daraus schließen, daß er zumindest einen Teil der antigenen Determinanten mit der Cytochromoxidase gemeinsam haben muß.

Zwei weitere Antikörperpräparationen waren ebenfalls in der Lage, den "Precursor" zu fällen (167).

Interessant ist, daß im Ouchterlony-Test aus der Cytosolfraktion mit isolierten Antikörpern gegen Cytochromoxidase eine Präzipitationslinie gefunden wurde (167).

b) das Molekulargewicht.

Mit einem Molekulargewicht von ca. 54 000 D ist der "Precursor" um ungefähr 5 000 D größer als die Summe der vier kleinen Untereinheiten. Das zusätzliche Peptid von ca. 40-50 Aminosäuren könnte nach dem Blobel-Dobberstein-Mechanismus für die Synthese von sekretorischen Proteinen die Funktion eines "Signalpeptids" haben.

Poyton et al. (74,75) konnten in S. cerevisiae ein Precursorprotein für die cytoplasmatischen Untereinheiten der Cytochromoxidase mit MW 55 kD aus dem Cytoplasma und aus Mitochondrienmembranen mit Antikörpern gegen Holocytochromoxidase

fällen. Dieses Protein zeigte Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen die isolierten Cytochromoxidaseuntereinheiten IV und VI. Postmitochondrialer Überstand , der mit Anti-Holocytochromoxidaseserum titriert war (wobei der Precursor präzipitiert wird), war im Gegensatz zu nichttitriertem Überstand außerstande, die Synthese der mitochondrialen Untereinheiten der Cytochromoxidase aufrecht zu erhalten. Die Identität des Precursors, der 0,3% des gesamten Zellproteins ausmacht, mit den 4 kleinen Untereinheiten der Cytochromoxidase wurde durch tryptische Peptide nachgewiesen. Im Cytoplasma konnten die Autoren weder mit Anti-Holocytochromoxidaseserum noch mit Antiseren gegen die Untereinheiten IV und VI einzelne Subunits des Enzyms nachweisen.

c) der Syntheseort.

Wie die Experimente mit den Hemmstoffen CHI/Emetin und CAP zeigten, wird das Protein im Cytoplasma synthetisiert, genau wie auch die vier kleinen Untereinheiten der Cytochromoxidase und das Precursorprotein von Poyton (74).

d) der Einbau von Radioaktivität unter PMSF-Zusatz.

Während der "Precursor" und die mitochonrialen Untereinheiten unter PMSF-Zusatz markiert werden, ist dies bei den vier kleinen Untereinheiten nicht der Fall.

Dies bedeutet, daß die kleinen Untereinheiten durch Proteolyse, die PMSF-hemmbar ist, auf jeden Fall aus einem Vorläuferprotein entstehen müssen. Unter den genannten Bedingungen wird gleichzeitig das Verschwinden des "Precursors" inhibiert (vgl. e).

e) die Kinetik der Markierung im Puls-Chase-Experiment.

Das Ansteigen der Radioaktivität in den kleinen Untereinheiten der Oxidase läßt sich- zumindest für die Untereinheiten IV und VI- mit dem Verschwinden der Radioaktivität aus dem "Precursor" während des Chase korrelieren.

f) das Auftreten "in vivo".

Der"Precursor" läßt sich auch "in vivo" aus Zellextrakten präzipitieren. Er zeigt dabei die gleiche typische Precursorkinetik wie "in vitro".

Gegen die Existenz eines derartigen "Precursors" sprechen die Befunde von V.Rücker et al. (71), die zeigen konnten, daß in N. crassa die Untereinheiten VI und VII getrennt und ohne Extrapeptid im cytoplasmatischen Überstand existieren. Weiterhin fanden Schwab et al. (81) unterschiedlich große Precursorpools der cytoplasmatischen Untereinheiten der Cytochromoxidase in N. crassa.
Abschließend sei noch erwähnt, daß für die kleine, cytoplasmatisch synthetisierte Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase, ein Enzym, das ähnlich wie die Cytochromoxidase von zwei getrennten genetischen Systemen abhängt, ein Precursorprotein von Dobberstein et al. beschrieben würde (168). Das Signalpeptid umfaßt dabei ca. 43 Aminosäuren und enthält überdurchschnittlich viel Methionin (169).

V Zusammenfassung

Methodisch aufbauend auf einer Zweistufenperfusion wurde eine eigenständige Technik zur Isolierung von Rattenleberparenchymzellen ausgearbeitet, die bei einem minimalen apparativen Aufwand in kurzer Zeit Zellen liefert, die in der Lage sind, die Proteinsynthese acht Stunden lang aufrechtzuerhalten.

Zur Bestimmung von Konzentrationen an Aminosäuren im Precursorpool der Proteinsynthese wurde infolge der Unsicherheit, die in der Literatur über die Natur des Precursorpools herrscht, die Methode der Isotopenverdünnung verwendet, die eine Lokalisierung dieses Pools unnötig macht.
Die auf diese Weise erhaltenen Daten über die Konzentration von Leucin im Precursorpool lassen einen ständigen Anstieg der Konzentration dieser Aminosäure über acht Stunden erkennen. Durch Vergleich mit Literaturdaten ergibt sich, daß der Precursorpool mit dem Pool an freiem Leucin in der Zelle nicht identisch ist.
Auf der Basis der Leucinkonzentrationen wurde die Proteinsyntheserate der Zellen bestimmt. Sie ist über acht Stunden konstant und beträgt ca. 99 pMole Leucin/mg Protein x Stunde, gleichbedeutend mit ca. 37% der Rate "in vivo". Dieser Wert deckt sich mit Daten über die Proteinsyntheserate in isolierten Hepatocyten, die in der Literatur auf andere Weise erhalten wurden.

Die Rate der Harnstoffsynthese lag mit 19 µMol/g Protein x Stunde über dem "in vivo"-Wert und bestätigt damit im Zusammenhang mit der Größe der Proteinsyntheserate die Angaben in der Literatur, daß sich isolierte Hepatocyten in einem proteinkatabolen Zustand befinden.

Aus der unterschiedlichen Wirkung von Inhibitoren der Proteindegradation auf Proteinsynthese und -abbau in den isolierten Zellen kann abgeleitet werden, daß Katabolismus und Anabolismus getrennt reguliert werden, in Übereinstimmung mit Berichten in der Literatur.

Gegen Cytochromoxidase aus Rattenleber wurden in Kaninchen Antikörper gewonnen, deren Spezifität durch verschiedene immunologische Methoden untersucht wurden. Mit diesen Antikörpern wurden Untersuchungen über die Biosynthese der Cytochromoxidase durchgeführt.
Aus radioaktiv markierten Zellextrakten ließ sich mit den erwähnten Antikörpern ein hochmarkiertes Protein (MW 48-54 kD) präzipitieren, während die Untereinheiten der Cytochromoxidase nur schwach markiert waren.
Das erwähnte hochmarkierte Protein zeigt im Puls-Chase-Experiment eine typische Precursorkinetik: es verschwindet wesentlich rascher als das Gesamtzellprotein. Zugleich mit der Abnahme der Radioaktivität dieses Proteins wächst die Radioaktivität in den Cytochromoxidaseuntereinheiten, die im Cytoplasma synthetisiert werden , an. Eine halbquantitative Korrelierung der Radioaktivitätsverschiebungen ist für zwei Untereinheiten möglich.
PMSF, ein Proteaseninhibitor, verhindert sowohl das Verschwinden des hochmarkierten Proteins als auch die Markierung der vier kleinen Untereinheiten der Cytochromoxidase.
Hemmstoffe der cytoplasmatischen und der mitochondrialen Proteinsynthese können den cytoplasmatischen Syntheseort des hochmarkierten Proteins sicherstellen.

Aufgrund der vorliegenden experimentellen Daten wird die Vermutung geäußert, daß das hochmarkierte Protein ein Precursor der vier kleinen, cytoplasmatisch synthetisierten Untereinheiten der Cytochromoxidase darstellt. Diese Vermutung wird anhand von Befunden aus der Literatur diskutiert.

VI Literaturverzeichnis

1.) Mac Munn, C. (1886)
Phil. Trans. Roy. Soc. London 177, 267

2.) Keilin, D. und Hartree, E. (1938) Nature 141, 870

3.) Straub, F. (1941) Z. Physiol. Chem. 268, 117-234

4.) Yakushiji, E. und Okonuki, K. (1940)
Proc. Imper. Acad. Tokyo 16, 299-302

5.) Lemberg, R. und Barrett, J. (1973)
in: Cytochromes 23-24, Academic Press

6.) Kadenbach, B. (1971) in: Autonomy and Biogenesis of Mitochondria and Chloroplasts 360, North-Holland

7.) Hundt, E. (1976) Diplomarbeit, Marburg

8.) Jacobs, E., Andrews, E., Cunningham, W. und Crane, F. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 96-104

9.) Jacobs, E., Cunningham, W., Andrews, E. und Crane, F. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 87-95

10.) Sun, F. und Jacobs, E. (1967)
Biochim. Biophys. Acta 143, 639-641

11.) Weiss, H. und Bücher, T. (1970)
Eur. J. Biochem. 17, 561

12.) Yonetani, T. (1961) J. Biol. Chem. 236, 1680-1688

13.) Brierley, G. und Merola, A. (1962)
Biochim. Biophys. Acta 64, 205

14.) Yu, C., Yu, L. und King, T. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 1383-1392

15.) Walter, H. und Hasselbach, W. (1973)
Eur. J. Biochem. 36, 110

16.) Spatz, L. und Strittmatter, P. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68, 1041

17.) Robinson, N. und Capaldi, R. (1977)
Biochem. 16 No.3, 375-381

18.) Caughey, W., Wallace, W., Volpe, J. und Yoshikawa, S. (1976) in: Enzymes XIII (Boyer, P. et al. eds.) 229-344, Academic Press

19.) Keilin, D. und Hartree, E. (1939) Proc. Roy. Soc. B. 127, 167-191

20.) Palmer, G., Babcock, G. und Vickery, L. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, No.7, 2206-2210

21.) Orii, Y. und King, T. (1976) J. Biol. Chem. 251 No 23, 7487-7493

22.) Petersen, L. und Andreasson, L. (1976) FEBS Lett. 66, No.1, 52-57

23.) Ferguson-Miller, S., Brautigan, D. und Margoliash, E. (1976) J. Biol. Chem. 251 No.4, 1104-1115

24.) Wikström, M., Harmon, H., Ingledew, W. und Chance, B. (1976) FEBS Lett. 65 No.3, 259-277

25.) Sebald, W., Weiss, H. und Jackl, G. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 413-417

26.) Sebald, W., Machleidt, W. und Otto, J. (1973) Eur. J. Biochem. 38, 311-324

27.) Mason, T., Ebner, E., Poyton, R., Saltzgaber, J., Wharton, D., Mennuci, J. und Schatz, G. (1972) in: Mitochondria/Biomembranes, 53-69, North Holland

28.) Mason, T. und Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1355-1360

29.) Rubin, M. und Tzagaloff, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4275-4279

30.) Komai, H. und Capaldi, R. (1973) FEBS Lett. 30 No.3, 273-276

31.) Briggs, M.,Kamp, P., Robinson, N. und Capaldi, R. (1975) Biochem. 14 No.23, 5123-5128

32.) Downer, N., Robinson, N. und Capaldi, R. (1976) Biochem. 15 No 13, 2930-2936

33.) Steffens, G. und Buse, G. (1976) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1125-1137

34.) Capaldi, R., Bell, R. und Branchok, T. (1977) Biochem.Biophys. Res. Comm. 74 No.2, 425-433

35.) Koch, G. (1976) J. Biol Chem. 251 No.19, 6097-6107

36.) Jeffreys, A. und Craig, J. (1977) FEBS Lett. 77 No2, 151-154

37.) Hofmann, H., Hundt, E. und Kadenbach, B. (1976) in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria, 827-830 (Bücher, Th. et al. eds.) North-Holland

38.) Weiss, H., Sebald, W., Bücher, Th. (1971) Eur. J. Biochem. 22, 19-26

39.) Saccone, C. und Quagliariello, E. (1975) Rev. Cytology 34, 125-165

40.) Wallace, R. und Freeman, K. (1974) Biochim. Biophys. Acta 366, 466-473

41.) Bianchetti, R., Luccini, G., Crosti, P. und Tortora, P. (1977) J. Biol. Chem. 252 No.8, 2519-1523

42.) Ruben, G., Telford, J. und Carroll, R. (1976) J. Cell Biol. 68, 724-739

43.) Schneider, D., Kagawa, Y. und Racker, E. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4074-4079

44.) Harmon, H., Hall, J. und Crane, F. (1974) Biochim. Biophys. Acta 344, 119-155

45.) Hare, J. und Crane, F. (1974) Sub-Cell. Biochem. 3, 1-25

46.) Eytan, G. und Schatz, G. (1975) J. Biol. Chem. 250 No.2, 767-774

47.) Cabral, F., Saltzgaber, J., Birchmeier, W., Debers, D., Frey, T., Kohler, C. und Schatz, G. (1976) in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria 215-230 (Bücher, Th. et al. eds.) Elsevier, North-Holland

48.) Birchmeier, W., Kohler, C. und Schatz, G. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4334-4338

49.) Eytan, G., Carroll, R., Schatz, G. und Racker, E. (1975) J. Biol. Chem. 250 No.22, 8598-8603

50.) Hackenbrock, C. und Hammon, K. (1975) J. Biol Chem. 250 No.23, 9185-9197

51.) Eytan, G., Matheson, M. und Racker, E. (1976) J. Biol. Chem. 251 No.21, 6831-6837

52.) Drachev, L., Jasaits, A., Severina, J., Kaulen, A., Kondrashin, A., Chu, L., Semenov, A. und Skulachev, V. (1976) J. Biol. Chem. 251 No.22, 7072-7076

53.) Eytan, G. und Racker, E. (1977) J. Biol. Chem. 252 No.10, 3208-3213

54.) Borst, P. (1972) Ann. Rev. Biochem. 41, 333-376

55.) Kroon, A., Agsteribbe, E. und de Vries, H. (1972) in: The Mechanism of Protein Synthesis and its Regulation 539-573 (Bosch, L. ed.)

56.) Storti, R. und Sinclair, J. (1974) Biochem. 13 No. 21, 4447-4455

57.) Groot, G., Flavell, R. und Sanders, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 378, 186-194

58.) Mahler, H. und Ruff, R. (1975) Rev. Cytology 34, 2-124

59.) Dawid, J. (1972) in: Mitochondria/Biomembranes 35-53 (van den Bergh, S. et al. eds.) North-Holland

60.) Swanson, R. (1971) Nature 231, 31-34

61.) Gaitskhoki, V. Kisselev, O. und Neifakh, S. (1973) FEBS Lett. 31 No.1, 93-96

62.) Dimitriadis, G. und Georgatsos, J. (1974) FEBS Lett. 46 No.1, 96-100

63.) Suyama, Y., Hamada, J. (1976) in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria 763-770 (Bücher, Th. et al. eds.) Elsevier, North-Holland

64.) Schatz, G. (1976) in: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria (Bandlaw, W. et al. eds.) 163-179, de Gruyter

65.) Ebner, E., Mason, T. und Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248 No.15, 5369-5375

66.) Slonimski, P. und Tzagaloff, A. (1976) Eur. J. Biochem. 61, 27-41

67.) Cabral, F., Rudin, Y., Solioz, M., Schatz, G., Clavilier, L. und Slonimski, P. (1977) Experientia 33 No.6, 789

68.) Hendler, F., Padmanaban, G., Patzer, J., Ryan, R. und Rabinowitz, M. (1975) J. Cell Biol. 67, 166

69.) Scragg, H., Eggitt, M. und Thomas, D. (1976) in: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria 215-240 (Bandlaw, W. et al eds.) de Gruyter

70.) Moorman, A., Grivell, L., Katan, M., van Ommen, G. und Meiland, C. (1976) in: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria, 259-269 (Bandlaw, W. et al. eds.) de Gruyter

71.) v. Rücker, A., Neupert, W. und Werner, S. (1976) in: Genetics, Biogenesis and Bioenergetics of Mitochondria (Bandlaw, W. et al. eds.) 259-269, de Gruyter

72.) Sebald, W., Schwab, A. und Bücher, T. (1969) FEBS Lett. 4, 243

73.) Sebald, W., Weiss, H. und Jackl, G. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 413-417

74.) Poyton, R. und McKemmie, E. (1976) in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, T. et al. eds.) 207-214, North-Holland

75.) Poyton, R. und Kavanagh, J. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 No.11, 3947-3951

76.) Ebner, E. und Maier, K. (1977) J. Biol. Chem. 252 No.2, 671-676

77.) Schatz, G. und Mason, T. (1974) Ann. Rev. Biochem. 43, 51-87

78.) Ebner, E., Mennucci, L. und Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5360

79.) Küntzel, H. und Blossey, H. (1974) Eur. J. Biochem. 47, 165

80.) Ibrahim, N. und Beattie, D. (1976) J. Biol. Chem. 251 No.1, 108-115

81.) Schwab, A., Sebald, W. und Weiss, H. (1972) Eur. J. Biochem. 30, 511-516

82.) Kellems, R., Allison, V. und Butow, R. (1974) J. Biol. Chem. 249 No.10, 3297-3303

83.) Kellems, L. und Butow, R. (1974) J. Biol. Chem. 249 No.10, 3304-3310

84.) Kellems, L., Allison, V. und Butow, R. (1975) J. Biol. Cell 65, 1-14

85.) Hallermeyer, G. (1977) Dissertation, München

86.) Hallermeyer, G. und Neupert, W. (1976) in: Genetics and Biogenesis of Chloroplasts and Mitochondria (Bücher, T. et al. eds.) 807-818, North-Holland

87.) Seglen, P. (1976) in: Methods of Cell Physiology (Prescott, D. ed.) 13, 29-83, Academic Press, New York

88.) Blouin, A. (1977) J. Cell Biol. 72, 441

89.) Schreiber, G. und Schreiber, M (1973)
Sub-Cell. Biochem. 2, 321-383

90.) Berry, M. und Friend, D. (1969) J. Cell Biol. 43, 506-520

91.) Friend, D. und Berry, M. (1970)
J. Ultrastruct. Res. 30, 252

92.) Howard, R., Christensen, A., Gibbs, F. und Pesch, L.
(1967) J. Cell Biol. 35, 675-684

93.) Seglen, P. (1973) Exp. Cell Res. 76, 25

94.) Capuzzi, D., Rothman, V. und Margolis, S. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 45 No.2, 421-429

95.) Moldeus, P., Grundin, R., Vadi, H. und Orrenius, S.
(1974) Eur. J. Biochem. 46, 351-360

96.) Wagle, S. und Ingebretsen, W. (1975) in: Methods in
Enzymology (Lowenstein, J. ed.) 35, 579-594

97.) Le Cam, A., Guillauzo, A. und Freychet, P. (1976)
Exp. Cell Res. 98, 382-395

98.) Drochmans, P., Wanson, J. und Mosselmans, R. (1975)
J. Cell Biol. 66, 1-22

99.) Hilderman, R., Goldblatt, P. und Deutscher, M. (1975)
J. Biol. Chem. 250 No.12, 4796-4801

100.) Daskal, J., Merski, J., Hughes, J. und Busch, H. (1975)
Exp. Cell Res. 93, 395-401

101.) Bojar, H., Balzer, K., Reiners, K., Basler, M., Reipen, W.
und Staib, W. (1975) Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13, 25-30

102.) Müller, M., Schreiber, M., Kartenbeck, J. und Schreiber
G. (1972) Cancer Res. 32, 2568-2576

103.) Seglen, P. und Reith, A. (1976)
Exp. Cell Res. 100, 276-280

104.) Seglen, P. und Reith, A. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 496, 29-35

105.) Wanson, J. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and
Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.)
185-199, North-Holland

106.) Weigand, K. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and
Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al.
eds.) 207-216, North-Holland

107.) Wisher, M. und Evans, W. (1977)
Biochem. J. 164, 415-422

108.) Wisher, M. und Evans, W. (1975)
Biochem. J. 146, 375-388

109.) Evans, W. (1977) TIBS 2 No.8, 169-171

110.) Crane, C. und Miller, D. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 60, 1269-1277

111.) Jeejeebhoy, K., Ho, J., Greenberg, G., Phillips, M., Bruce-Robertson, A. und Suthe, U. (1975)
Biochem. J. 146, 141-155

112.) Anwer, M. Kroker, R. und Hegner, B. (1975)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 64, 603-608

113.) Ingebretsen, W. und Wagle, S. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 403-410

114.) Quistorff, B., Bondesen, S., Grunnet, N. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 320, 503-516

115.) Seglen, P. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 338, 317-336

116.) Williamson, J., Browning, E. und Schatz, R. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4607-4616

117.) Johnson, M. Das, A., Butcher, F. und Fain, J. (1972) J. Biol. Chem. 247 No.10, 3229-3235

118.) Wagle, S. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59, 1366-1372

119.) Katz, J., Golden, S. und Walz, P. (1976)
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 No.10, 3433-3437

120.) Katz, N. und Jungermann, K. (1976)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 358-375

121.) Katz, J., Rognstad, R., Golden, S. und Walz, P. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 237-282, North-Holland

122.) Hensgens, H., Hensgens, L., Meijer, A., Gimpel, J. und Tager, J. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kideny Tubules in Metabolic Studies (Tager et al. eds.) 335-338 North-Holland

123.) Krebs, H., Cornell, N., Lund, P. und Hems, R. (1975) in : Regulation of Hepatic Metabolism (Lundquist, F. et al. eds.) 726-750 Munksgaard, Copenhagen

124.) Hems, D. (1977) FEBS Lett. 80 No.2, 237-245

125.) Garrison, J. und Hynes, R. (1975)
J. Biol. Chem. 250 No.8, 2769-2777

126.) Van de Werve, G., Hue, L. und Hers, H-G. (1977)
Biochem. J. 162, 135-142

127.) Wagle, S. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Comm. 59 No.4, 1366-1372

128.) Seglen, P. (1973) FEBS Lett. 36, 309-312

129.) Seglen,P. (1973) FEBS Let. 30, 25-28

130.) Braer, Y., Foudereau, M., Rancon, F., Freychet, P. und Rosselin, G. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabilic Studies Tager, J. et als eds., 434-437, North-Holland

131.) Le Cam, A. und Freychet, P. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 438-441 North-Holland

132.) Friedrichs, D. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 444-447, North-Holland

133.) Flockhart, D. Siddle, K. und Wales, C. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 448-449, North-Holland

134.) Pariza, M. Kletzien, R., Butcher, F. und van Potter, R. (1976) Adv. Enz. Regul. 103-115

135.) Veneziale, C., Lohmar, P. (1973)
J. Biol. Chem. 248 No.22, 7786-7791

136.) Pointer, R., Butcher, F. und Fain, J. (1976)
J.Biol. Chem. 251 No. 10, 2987-2992

137.) Tolbert, M. Butcher, F. und Fain, J. (1973)
J. Biol. chem. 248 No.16, 5686-5692

138.) Eckel, J. und Breuer, H. (1977)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 229

139.) Weigand, K., Müller, M., Urban, J. und Schreiber, G. (1971) Exp. Cell Res. 67, 127-129

140.) Högberg, J. und Kristoffersen, A. (1977)
Eur. J. Biochem. 74, 77-82

141.) Weigand, K. und Otto, J. (1974)
FEBS Lett. 46 No.1, 127-129

142.) Edwards, K, Schreiber, G., Dryburgh, H., Urban, J. und Inglis, A. (1976) Eur. J. Biochem. 63, 303-311

143.) Seglen, P. (1976) Biochim. Biophys. Acta 442, 391-404

144.) Edwards, K., Fleischer, B., Dryburgh, H., Fleischer, S. und Schreiber, G. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 72 No.1, 310-318

145.) Seglen, P. und Reith, A. (1976)
Exp. Cell Res. 100, 276-280

146.) Seglen, P. (1977) Biochim. Biophys. Acta 496, 182-191

147.) Seglen, P. und Reith, A. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 496, 29-35

148.) Meijer, A., Gimpel, J., Deleeuw, G., Tager, J. und Williamson, J. (1975)
J. Biol. Chem. 250 No.19, 7728-7738

149.) Sies, H., Akerboom, T. und Tager, J. (1977)
Eur. J. Biochem. 72, 301-307

150.) Sakakibara, K., Saito, M., Umeda, M., Enaca, K. und Tszakada, Y. (1976) Nature 262, 316-318

151.) Seglen, P. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J., Söling, H., Williamson, J. eds.) 245-256, North-Holland

152.) Sies, H., Summer, K., Häussinger, D. und Bücher, Th. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells in Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 311-316, North-Holland

153.) McGivan, J. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Sudies (Tager, J. et al. eds.) 325-328, North-Holland

154.) Willamson, J., Gimpel, J., Meijer, A., Deleeuw, S. und Refesio, C. (1976) in: Use of Isolated Liver Cells and Kidney in Metabolic Studies
(Tager, J. et al. eds) 339-349, North-Holland

155.) Bojar, H., Balzer, K., Basler, M., Wittliff, M., Staib, W., van der Meulen, N. und Sekeris, C. (1974)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 1180

156.) Sestoff,L. und Fleron, P. (1973) in : Regulation of Hepatic Metabolism (Lundquist, F. et al. eds.) 765-777, Munksgaard, Copenhagen

157.) Pariza, M., Kletzien, R., Butcher, F. und Potter, V. (1976) Adv. Enz. Regul. 14, 103-115

158.) Kletzien, R., Pariza, M., Becker, J. und Potter, V. (1975) Nature, 256, 46-47

159.) Pariza, M., Butcher, F. und Potter, V. (1976) Fed. Proc. 35, 1759

160.) Baur, H. und Heldt, H. (1976) in : Use of isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 357-362, North-Holland

161.) Baur, H. und Heldt, H. (1977) Eur. J. Biochem. 74, 397-403

162.) Le Cam, A. und Freychet, P. (1977) J. Biol. Chem. 252 No.1, 148-156

163.) Pariza, M., Butcher, F., Kletzien, R., Becker, J. und Potter, V. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73 No.12, 4511-4515

164.) McGivan, J., Bradford, N. und Mendes-Mourao, J. (1977) FEBS Lett. 80 No.2, 380-384

165.) Kletzien, R., Pariza, M., Becker, J. und van Potter, r. (1976) J. Cell Physiol. 89, 641-646

166.) Le Cam, A. und Freychet, P. (1976) Biochem. Biophys. Res. Comm. 72 No.3, 893-901

167.) East, A., Louis, L. und Hoffenberg, R. (1973) Exp. Cell Res. 76, 41-46

168.) Feldhoff, R., Taylor, J. und Jefferson, L. (1977) J. Biol. Chem. 252 No.11, 3611-3616

169.) Berg, T., Boman, D. und Seglen, P. (1972) Exp. Cell Res. 72, 571-574

170.) Burton, D., Collins, J. und Porter, J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 1076-1083

171.) Edwards, A. und Elliott, W. (1974) J. Biol. Chem. 249, 851-855

172.) Wagle, S. und Ingebretsen, W. (1975) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 480-485

173.) Peters, T. und Peters, J. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 3858-3863

174.) Hopgood, M., Clark, M. und Ballard, F. (1977)
Biochem. J. 164, 399-407

175.) Tager, J. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 257, North-Holland

176.) Ontko, J. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1788-1800

177.) Gibson, D. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 219-230, North-Holland

178.) Thieden, H., Quistorff, B., Schmer, J. und Grunnet, N. (1976) in : Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies (Tager, J. et al. eds.) 233-241, North-Holland

179.) Moldeus, P., Grundin, R., Vadi, H. und Orrenius, S. (1974) Eur. J. Biochem. 46, 351-360

180.) Seglen, P. (1973) Exp. Cell Res. 82, 391-398

181.) Hanks, J. und Wallace, R. (1949)
Proc. Exp. Biol. Med. 71, 196-200

182.) Seglen, P. (1972) Biochim. Biophys. Acta 264, 398-410

183.) Seglen, P. (1973) Exp. Cell Res. 74, 450-454

184.) Umbreit, W., Burris, R. und Stauffer, J. (1972)
Manometric and Biochemical Techniques 146-147

185.) Kadenbach, B. (1966) Biochem. Z. 344, 49-75

186.) Lowry, V., Rosebrough, N., Farr, A. und Randall, R. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265

187.) Weber, K. und Osborn, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

188.) Hofmann, H. (1975) Diplomarbeit, Marburg

189.) Swank, R. und Munkres, K. (1971)
Anal. Biochem. 39, 462-477

190.) Joustra, M. und Lundgren, H. (1969) in : Protides of the Biological Fluids : Proc. 17 Colloqu. Bruges, 511

191.) Kirchner, C. und Bichler, K. (1976) Urol. Res. 4 No.3, 120

192.) Ouchterlony, Ø. (1948)
Arkivkomi Mineral. Geol. 26 B, 1

193.) Ouchterlony, Ø. (1967)
in : Handbook of experimental immunology (Weir, D. ed.)
655 Blckwell Scientific Publication

194.) Schwick, H., Störiko, K. und Becker, W. (1971)
Laboratoriumsblätter für die medizinische Diagnostik
3, 1-59

195.) Heidelberger, M. und Uendull, F. (1929)
J. Exp. Med. 50, 809

196.) Heidelberger, M. (1939) Bacteriol. Rev. 3, 49

197.) Hackenbrock, C. und Hammon, K. (1975)
J. Biol. Chem. 250 No.2, 9185-9197

198.) Poyton, R. und Schatz, G. (1975)
J. Biol. Chem. 250 No.2, 762-766

199.) Ries, G. (1975) Diplomarbeit, Marburg

200.) Hadvary, P. (1975) Dissertation, ETH Zürich

201.) Ouchterlony, Ø. (1977) in :
Handbook of experimental immunology (Weir, D. ed.)
19.1-19,39 Blackwell Scientific Publications

202.) Clausen, J. (1969) in :
Laboratory techniques in biochemistry and molecular
biology III (Work, T. et al. eds.)

203.) Davis, B., Dulbecco, R., Eisen, H., Ginsberg, H. und
Wood, W. (1973) Microbiology, 358-524, Harper & Row

204.) Steward, M. (1974) Immunochemistry, Chapman & Hall

205.) Cooper, T. (1977) in :
The Tools of Biochemistry 256-308, Wiley & Sons

206.) Roitt, M. (1977) Essential Immunology,
Blackwell Scientific Publications

207.) Bjerrum, O. und Bøg-Hansen, T. (1976) in :
Biochemical Analysis of Membranes 378-426 (Maddy, A.
et al. eds.), Chapman & Hall

208.) Poyton, R. und Schatz, G. (1975)
J. Biol. Chem. 250 No.2, 762-766

209.) Werner, S. (1977) Eur. J. Biochem. 79, 103-110

210.) Hundt, E. und Kadenbach, B. (1977)
Hoppe Seyler' Z. Physiol. Chem. 358, 1309-1314

211.) Hundt, E. (1977) priv. Mitteilung

212.) Kabat, E. und Mayer, M. (1961) zitiert in Ref. 205

213.) Munn, E. (1974) in: The Structure of Mitochondria
(Munn, E. ed.) Academic Press

214.) Sato, N., Hagihara, B., Komada, T. und Abe, H. (1976)
Anal. Biochem. 74, 105-117

215.) Nicholls, P. und Elliott, W. (1974) in: Iron in
Biochemistry and Medicine (Jacobs et al. eds.)
221-277, Academic Press

216.) Schimassek, H. und Gerok, W. (1965)
Biochem. Z. 343, 407-415

217.) Berry, M. und Werner, H. (1975) in: Regulation of
Hepatic Metabolism
(Lundquist, F. et al. eds.) 751-753, Munksgaard

218.) Ip, M., Chu, P. und Swick, R. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 354, 29-38

219.) Satav, J., Katyare, S., Fatterpaker, P. und Sreeni-
vassan, A. (1977) Eur. J. Biochem. 73, 287-296

220.) Ellis, R. (1977) Biochim. Biophys. Acta 463, 185-215

221.) Sullia, S. und Griffin, D. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 475, 14-22

222.) CH'JH, J., Pike, L. und Devlin, T. (1977)
Biochem. J. 168, 57-63

223.) CH'JH, J., Procyk, R. und Devlin, T. (1977)
Biochem. J. 162, 501-507

224.) Banerjee, D. und Redman, C. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 500, 49-60

225.) Grisolia, S., Rivas, J., Wallace, R. und Mendelson, J.
(1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 77 No.1, 367-373

226.) Ibrahim, N., Berke, J. und Beattie, D. (1974)
J. Biol. Chem. 249 No.21, 6806-6811

227.) Kroon, A. und Arendzen, A. (1972) in: Mitochondria/
Biomembranes (van der Bergh et al. eds.)
71-84, North-Holland

228.) Morgan, H., Earl, D., Broadus, A., Wolpert, E., Giger, K. und Jefferson, L. (1971) J. Biol. Chem. 246 No.7, 2152-2162

229.) Wettenhall, R. und London, D. (1975) Biochim. Biophys. Acta 390, 363-373

230.) Mowbray, J. und Last, K. (1974) Biochim. Biophys. Acta 349, 114-122

231.) Alpers, D. und Thier, S. (1972) Biochim. Biophys. Acta 262, 535-545

232.) Mortimore, G., Woodside, K. und Henry, J. (1972) J. Biol. Chem. 247 No.9, 2776-2784

233.) Hod, Y. und Hershko, A. (1976) J. Biol. Chem. 251 No.14, 4458-4467

234.) Peavy, D. und Hansen, R. (1976) Biochem. J. 160, 797-801

235.) Hider, R., Fern, E. und London, D. (1969) Biochem. J. 114, 171-178

236.) Venrooij, W., Moonen, H. und van Loon-Klaassen, L. (1974) Eur. J. Biochem. 50, 297-304

237.) Airhart, J., Vidrich, A. und Khairallah, E. (1974) Biochem. J. 140, 539-548

238.) Vidrich, A., Airhart, J., Bruno, M. und Khairallah, E. (1977) Biochem. J. 162, 257-266

239.) Rubin, J. und Goldstein, G. (1970) Anal. Biochem. 33, 244-254

240.) Woodside, K. und Mortimore, G. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4774-4781

241.) Malette, L., Exton, J. und Park, C. (1969) J. Biol. Chem. 244 No.20, 5724-5728

242.) Peters, T. und Peters, J. (1972) J. Biol. Chem. 247 No.12, 3858-3863

243.) Wagle, S. und Ingebretsen, W. (1975) Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 149, 480-485

244.) Mathews, R., Oronsky, A. und Haschemeyer, A. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1329-1333

245.) Mathews, R. und Haschemeyer, A. (1976) Biochim. Biophys. Acta 425, 220-228

246.) May, C., Drochmans, P., Wanson, J. und Penasse, W. (1974) Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 61

247.) Rognstadt, R. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 496, 249-254

248.) Wagle, S. und Sampson, J. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 72-80

249.) Ingebretsen, W., Moxby, M., Allen, D. und Wagle, S. (1972) Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 601-606

250.) Crane, L., Greenblatt, C. und Miller, D. (1975)
Fed. Proc. 34, 620

251.) Goldberg, A. und Dice, J. (1974)
Ann. Rev. Biochem. 43, 835-869

252.) Schimke, R. (1973)
Adv. Enzymol. Areas Mol. Biol. 37, 135-187

253.) Wittmann III, J. und Jacobus, K. (1977)
Anal. Biochem. 79, 58-62

254.) Kairallah, E. und Mortimore, G. (1974)
Fed. Proc. 34, 501

255.) Fern, E., Hider, R. und London, D. (1971)
Eur. J. Clin. Invest. 1, 211-215

256.) Gebhardt, R. (1977) priv. Mitteilung
Physiologisch-Chemisches Institut, Tübingen

257.) Garlick, P., Millward, D., Jones, W. und Waterlow, J. (1975) Biochim. Biophys. Acta 414, 71-84

258.) Scornik, O. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47, 1063-1066

259.) Blobel, G. und Dobberstein, B. (1975)
J. Cell Biol. 67, 852-862

260.) Jefferson, L. und Korner (1969) Biochem. J. 111, 703-712

261.) Constantino, P. und Attardi, G. (1977)
J. Biol. Chem. 252 No.6, 1702-1711

262.) Tzagaloff, A., Akai, A. und Needleman, R. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8228

263.) Kadenbach, B. (1969) Eur. J. Biochem. 16, 312

264.) Küntzel, H., Pieniazek, N., Pieniazek, D. und Leister, D. (1975) Eur. J. Biochem. 54, 567

265.) Mason, T., Poyton, R., Wharton, D. und Schatz, G. (1973) J. Biol. Chem. 248, 1346

266.) Phan, S. und Mahler, H. (1976) J. Biol. Chem. 251, 257

267.) Hundt, E. (1977) Dissertation in Vorbereitung

268.) Dobberstein, B., Blobel, G. und Nam-Hai Chua (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 No.3, 1082-1085

269.) Dobberstein, B. (1977) persönliche Mitteilung

270.) Bergmeier, H., Gawehn, K. und Graßl. M. (1974) Methoden der enzymatischen Analyse, 1842-1846, Verlag Chemie

271.) Poyton, R. und Groot, G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 No.1, 172-176

272.) Werner, S. (1974) Eur. J. Biochem. 43, 39-48

Für die Immunisierung von Kaninchen bin ich
Herrn Prof. Dr. C. Kirchner (FB Biologie) sowie
Herrn Dr. habil. K. Radsack (FB Humanmedizin),
für die Überwanderungselektrophorese mit Antiserum A
Herrn Prof. Dr. W. Schiff (FB Humanmedizin)
sehr zu Dank verpflichtet.

Diese Arbeit wurde durch finanzielle Unterstützung
durch den Sonderforschungsbereich 103, Marburg, sowie
durch die Friedrich-Ebert-Stiftung, Bonn,
ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach

danke ich herzlich für die interessante Themenstellung, für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit, sowie für seine ständige Hilfsbereitschaft und Förderung in jeglicher Hinsicht.

Lebenslauf

21. Juni 1949	geboren in Oestrich/Rheingau
1955-1959	Volksschule Oestrich
1959-1967	Besuch der Rheingauschule Gymnasium Geisenheim (Abitur)
1967-1968	Grundwehrdienst
seit SS 1969	Studium der Chemie der Philipps-Universität in Marburg
13. März 1975	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
Juni 1974 bis März 1975	Anfertigung der Diplomarbeit - "Bindung von ^{32}P-Phosphat an Chloroformextrakte aus Rattenlebermitochondrien" - unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach
Mai 1975 bis Oktober 1977	Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. B. Kadenbach in der Abteilung Biochemie des chemischen Instituts